

**Identifizierung und Charakterisierung eines
Genorts der Maus für immunologische und
pathologische Lipid A-Wirkungen**

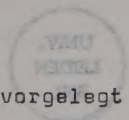
Ulrike Flügge-Rank

1974

Aus den Abteilungen für Experimentelle Medizin
(Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer)
und für Molekulare Biologie der Genwirkung
(Direktor: Prof. Dr. W. Zillig)
am Max-Planck-Institut für Biochemie,
Martinsried bei München

Identifizierung und Charakterisierung eines
Genorts der Maus für immunologische und
pathologische Lipid A-Wirkungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin verfaßt und einer Hohen Medizinischen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München


vorgelegt von
Ulrike Flügge-Rank
aus Hof

1974

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer
Mitherberichterstatter: Prof. Dr. Dr. W. Brendel
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5. November 1974



Bestimmung

Bestimmung: Welche Punkte sind einer Tabelle, die die Auftragsanforderung enthält.

Einleitung und Aufgaben

Einleitung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Dr. W.-R. Rank durchgeführt.

Auftrag 1.

1. Die Aufgabenstellung ist die, dass die Auftragsanforderung in der Tabelle...

Herrn Prof. Drs. A. Butenandt, Herrn Prof. Dr. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer, Herrn Prof. Dr. W. Zillig und Herrn Dr. W.-R. Rank danke ich sehr herzlich für die großzügige Förderung der Arbeit.

Auftrag 11. Die Tabelle der Werte in der Tabelle der Werte...

1. Die Tabelle der Werte in der Tabelle der Werte...
2. Die Tabelle der Werte in der Tabelle der Werte...
3. Die Tabelle der Werte in der Tabelle der Werte...

Inhaltsübersicht

	Seite
Abkürzungen	1
Problemstellung: Suche nach einer Mutation, die die Antikörperspezifität betrifft	2
<u>Material und Methoden</u>	4
<u>Ergebnisse</u>	
<u>Kapitel I. Der Lipid A-induzierte Antikörper</u>	7
1. Die Lipopolysaccharide vieler Enterobakterien induzieren einen Antikörper, der mit Schafer erythrozyten reagiert	7
2. Lipid A induziert Antikörper gegen Schafer erythrozyten	14
3. Der Lipid A-induzierte Antikörper reagiert mit Erythrozyten mehrerer Tierspezies	17
4. Kinetik des Auftretens des Lipid A-induzierten Antikörpers	19
<u>Kapitel II. Ein Genort der Maus kontrolliert die durch Lipid A induzierten Reaktionen Antikörperbildung, Entzündung, Körpertemperaturabfall und letale toxische Reaktion</u>	26
1. Der Mäuse-Inzucht-Stamm C3H/HeJ kann keine Antikörper nach Lipid A-Injektion bilden	26
2. Identifizierung eines Mendelschen Genorts (Ir-L) für das Auftreten von Antikörpern nach Lipid A-Injektion	30

3. Eine Spontanmutation ist die Ursache der Unfähigkeit des Mäusestammes C3H/HeJ Lipid A-induzierte Antikörper zu bilden 34
4. Das Gen Ir-L kontrolliert die Entzündungsreaktion 36
5. Das Gen Ir-L kontrolliert den Lipopolysaccharid-induzierten Körpertemperaturabfall 48
6. Das Gen Ir-L kontrolliert die letale toxische Reaktion 54

Besprechung 55

Zusammenfassung 63

Literaturverzeichnis 65

Lebenslauf 69

Abkürzungen

LPS	Lipopolysaccharid(e)
Lip A	Lipid A
PbZ	Antikörper-Plaques-bildende Zelle(n)
SE	Schäfererythrozyt(en)
PBS	Phosphat-gepufferte, physiologische Kochsalzlösung, pH 7,4
Mono	Monozyt(en)
Makro	Makrophage(n)
Eo	Eosinophile(r) Granulozyt(en)
Baso	Basophile(r) Granulozyt(en)
Neutro	Neutrophile(r) Granulozyt(en)
Stab	Stabkernige(r), neutrophile(r) Granulozyt(en)
i.p.	intraperitoneal
KDO	2-Keto-3-desoxyoktensäure
Pe	Phosphoryläthanolamin
hep	Heptose
P	Phosphat
Glc	Glukose
Gal	Galaktose
o	Körperantigen von Bakterien
R	Rauhform (-Körperantigen) von Bakterien
S	Glatthform von Bakterien
S.	Salmonella
E.c.	Escherichia coli
m	minnesota
B-Zelle	Knochenmarkslimphozyt
T-Zelle	Thymuslimphozyt

Die Immunologie befaßt sich unter anderem mit folgenden zwei Phänomenen:

- a) dem Zustandekommen der Spezifität der Antikörper und
- b) der Vermeidung von Antikörpern, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind (Autoantikörper).

Beim Vergleich der Aminosäuresequenz von Immunglobulinen fand man, daß in den Bereichen, die der Antikörper-Haftstelle zugeschrieben werden, Homologien bestehen (59). Dies spricht für eine Vererbung zumindest von Teilen der Primärstruktur. Ob die gesamte Aminosäuresequenz der Antikörper-Haftstelle vererbt wird, ist noch nicht geklärt.

Beim derzeitigen Stande der Erkenntnis spielen bei dem Mechanismus, der zum Auftreten der Antikörper-Spezifität führt, außerdem eine Rolle: das Thymusorgan (46), das Geschlecht (64), der immunologische Schlepper, an den das Antigen gebunden ist (50) und die Blutgruppe (25). Bei der Maus sind drei Gene identifiziert worden, die das Auftreten spezifischer Antikörper kontrollieren. Eines der drei Gene liegt auf dem 2. Chromosom (27), das 2. Gen auf dem 17. Chromosom (44).

Um mehr über diesen Zuordnungsmechanismus zu erfahren, habe ich bei Mäusen nach Mutanten gesucht, die unfähig sind, nach Immunisierung mit bestimmten Antigenen zugehörige Antikörper zu bilden. In dieser Arbeit wird eine Mäusemutante beschrieben, die nach Injektion von Lipid A keine entsprechenden Antikörper bilden kann. Mit Hilfe dieser Mutante gelang es zu zeigen, daß die Antikörperbildung nach Injektion von Lipid A im Zusammenhang steht mit der Entzündung, der Wärmeregulation und der letalen toxischen Reaktion.

Als Antigene benutzte ich Lipopolysaccharide (LPS) von Enterobakterien. Diese bestehen aus einem Polysaccharidteil, der die für die verschiedenen Enterobakterienstämme charakteristischen O-spezifischen Antigen-Determinanten trägt. An diesen Polysaccharidteil ist konvalent die Basalstruktur gebunden. Sie trägt die R-spezifischen Antigen-Determinanten und besteht aus einem Oligosaccharid und dem Lipid A (68). Lipid A setzt sich aus Einheiten eines β -1,6-verknüpften D-Glukosamin-Disac-

charids zusammen, bei dem die Hydroxyl- und Aminogruppen mit Laurinsäure, Palmitinsäure und β -Hydroxymyristinsäure acyliert sind (54).

Die Einheiten sind über 1,4-Phosphodiesterbrücken miteinander verbunden. Lipid A läßt sich durch Säurehydrolyse vom Zuckeranteil abspalten.

Die meisten Reaktionen der Säugetiere nach Kontakt mit Enterobakterien werden durch die Lipopolysaccharide der Bakterienzellwand bewirkt.

Innerhalb der Lipopolysaccharid-Moleküle konnten die meisten biologischen Effekte der Lipid A-Komponente zugeordnet werden. Die Injektion von gereinigtem Lipid A bewirkt Fieber (42), letale toxische Reaktionen (68), eine erhöhte Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (5), Leukopenie mit anschließender Leukozytose, eine unspezifische Immunität gegen Bakterieninfektionen (34), eine Hemmung des Wachstums von Tumoren (56, 65), eine Stimulierung der Antikörperbildung (Adjuvans-Wirkung) und Knochenmarksnekrosen (67).

Im Kapitel I wird der Lipid A-induzierte Antikörper näher charakterisiert und im Kapitel II die Mutation beschrieben, die die Synthese dieses Antikörpers betrifft.

Material und Methoden

1. Mäuse: Nomenklatur und Abkürzungen: "Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice" (62).

Die Herkunft der meisten hier benutzten Mäuse-Inzuchtstämme ist in der Zeitschrift "Mouse News Letter" beschreiben (52).

Herkunft weiterer Inzuchtstämme:

AKR/J, AKR.M, B10.BR/SgSn, CBA/H/J-T6/T6, C57B1/10Sn, C3H/HeJ-ho-like/ho-like, DBA/1J, I/LnJ, NZB/B1nJ, SJL/J, von Jax im Jahre 1972.

Balb/c/A/Bom-nu/nu von Bom 1972.

F/St, NZW von Lac 1973.

N/St von Strong 1973.

Herkunft von Koloniezuchtstämmen:

NaIcr von MusRattus AG, D-8011 Brunnthal, 1971.

NMRI/Mb von Rajewski, Inst. f. Genetik, Univ. Köln, 1969.

Sab von Sandoz AG, Basel, 1965.

Bei allen Versuchen, bei denen das Geschlecht der Tiere nicht angegeben ist, wurden Männchen und Weibchen zu ungefähr gleichen Teilen eingesetzt.

Das Alter der Tiere lag zwischen 10 und 50 Wochen.

2. Antikörper-Plaques-Test: Die Durchführung erfolgte nach (51).

Objektträgeragglutinationstest: (30)

Anti-S.-Faktor 4-Serum: Behringwerke Marburg

3. Bakterienstämme: Die *S. cholerae suis*-Stämme und *S. strasbourg* stammten von H. Momenteau und L. LeMinor, Internationale Salmonella-Zentrale (Institut Pasteur, Paris), die *E.c.*-Stämme von F. Ørskov (Statens Seruminstitut, Kopenhagen), der *Shigella sonnei* (Phase II)-Stamm von M. Mulczyk (Institut Immunologii i Terapii, Breslau), die *S.-R*-Formen von O. Lüderitz (Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg), und die *S.-O*-Formen von R. Rohde (Nationale Salmonella-Zentrale, Hygiene-Institut, Hamburg).

4. Lipopolysaccharide und Lipid A waren nach (51) hergestellt worden.

5. Milzexstirpation bei Mäusen: In Äthernarkose wurde über der Milz ein 1,5 cm langer Hautschnitt ausgeführt. Dann wurde die darunterliegende Bauchwand durch einen 1 cm langen Schnitt unter Schonung von Gefäßen und Nerven eröffnet und die Milz mit einer flachen anatomischen Pinzette herausgelagert. Der gesamte Milzstiel wurde durch eine Ligeratur unterbunden und dann die Milz abgetragen. Schließlich wurde die Bauchwand fortlaufend und die Haut mit Einzelnähten vernäht.

6. Entzündungsreaktion: LPS oder Lipid A, gelöst bzw. suspendiert in 1 ml PBS, wurde Mäusen in 2 Portionen zu je 0,5 ml in die linke und rechte Seite des Abdomens i.p. injiziert. Nach 48 Stunden wurde in Äthernarkose die Haut über dem Abdomen durch einen medianen Längsschnitt eröffnet. Bei der Injektion von 5 ml PBS mit 5 I.E. Heparin in die Bauchhöhle wurde darauf geachtet, daß kein Blutgefäß verletzt wird. Durch leichtes Schütteln des Abdomens wurden die Zellen suspendiert. Die zellhaltige Spülflüssigkeit wurde dann aus der Bauchhöhle mittels Spritze und Nadel wieder zurückgesogen, wobei es meistens gelang, 3,5 ml zurückzugewinnen. Eine Probe dieser Zellsuspension wurde mit der gleichen Menge 2 %iger Essigsäure versetzt und zur Bestimmung der Zellkonzentration in der Zählkammer benutzt. Die restlichen Zellen wurden abzentrifugiert. Sodann wurde die überstehende Flüssigkeit dekantiert. Das Zellsediment wurde mit einem Schweineborstenpinsel der Größe 4 aufgenommen, auf fettfreien Objektträgern ausgestrichen und sofort mit einem kalten Fön getrocknet. Die Färbung erfolgte nach Pappenheim (31).

7. Temperaturmessung: Die Versuchsmäuse wurden mit Tesa-Klebeband auf dem Rücken liegend an den 4 Extremitäten so auf ein Brett geklebt, daß sie noch einen möglichst großen Bewegungsspielraum hatten. Die Messung erfolgte mit dem Medizinischen Sekundenthermometer und einer zylindrischen, 3 mm starken, ca. 1,5 cm weit rektal eingeführten Thermosonde der Firma Armatherm, Lemgo. Die Spannung der Sonde wurde auf einem Spannungs-Zeit-Schreibgerät fortlaufend registriert. Das Registriergerät war zuvor durch Eintauchen der Sonde in warmes Wasser bekannter Temperatur und Ablesen der zugehörigen Spannung geeicht worden.

2 mg LPS wurden in 1 ml PBS gelöst und i.p. injiziert.

Ergebnisse

=====

Kapitel I. Der Lipid A-induzierte Antikörper

1. Die Lipopolysaccharide vieler Enterobakterien induzieren einen Antikörper, der mit Schaferythrozyten reagiert

Die Antikörper, die nach Immunisierung mit Enterobakterien auftreten und mit der Methode der Bakterienagglutination nachgewiesen werden, sind überwiegend gegen die O-Determinanten des spezifischen Polysaccharidteils der LPS gerichtet (65). Antikörper gegen R-Determinanten erhält man nach Immunisierung mit Enterobakterien, die ihre O-Determinanten durch Mutation verloren haben (R-Formen). Evidenz für einen weiteren Antikörper, den sowohl LPS mit O- als auch mit R-Determinanten induzieren, kann man aus einer Reihe von Veröffentlichungen entnehmen:

Die Anzahl von Antikörper-Plaques-bildenden Zellen in der Milz (PbZ), die Antikörper gegen normale Schaferythrozyten (SE) bilden, steigt an, wenn man Mäuse mit verschiedenen Stämmen und Präparationen von Bakterien immunisiert, z.B. mit *Escherichia coli* (E.c.) O 127- oder *Aerobacter aerogenes*-Bakterien (56, 7), Typhus-Paratyphus-Vakzine (33), Boivin-Endotoxin (43) von *Serratia marcescens* (3,18), *Salmonella* (S.) *abortus equi*, *S. typhi* und E.c., proteinhaltigem und proteinfreiem Ribi-LPS (43) von *S. enteritidis* und Westphal-LPS (43) von *Serratia marcescens*, *S. abortus equi* (16, 17, 19, 20, 21), *S. milwaukee*, *S. rubislaw*, *S. ghana*, *S. chittagong*, *S. schleissheim*, *S. siegburg* und von den *S. minnesota* R-Mutanten mR60, mR7 und mR595 (51).

Aus diesen Ergebnissen kann man entnehmen, daß es in den LPS vieler Enterobakterien eine Ag-Determinante gibt, die mit SE kreuzreagiert.

Tab. 1. Induktion von Antikörpern gegen Schafererythrozyten durch Lipopolysaccharide von Enterobakterien. Jeder Wert gibt die Zahl der Zellen/Milz mit Antikörpern gegen Schafererythrozyten einer SaB-Maus an.
+ bedeutet den Tod eines Tieres

Enterobakterienstamm, aus dem das zur Immunisierung benutzte Lipopolysaccharid extrahiert wurde:		Sero- typ	Chemo- typ	5-10	20-50	100-200	300-1000	2000-5000	Zahl der direkte Antikörper-Plaques bildenden Zellen/Milz, 4 Tage nach der i.p. Injektion einer Lipopolysaccharid-Dosis (µg) von:	
		B	XVI	37	90	300	420	+		
S. schleissheim				68	200	390	630			
				105	220	4800	630			
				150	270	+	1320			
				190	840		2200			
				273	1180		2200			
S. typhimurium		B	XIV			2590				
S. cholerae suis 62, 7		C1	III	105	60	2235				
S. cholerae suis 62, 7, 14		C1	III		550	2200				
S. cholerae suis 61, 7		C1	III	130	100	3455				
S. strasbourg		D	XVI	440	360	642	2220			
						1935				
S. anatum		E1	XIII			+				
S. newington		E2	XIII		100		1500	+		
S. illinois		E3	XIII		160	3265				
S. senftenberg		E4	XIII		370	2350				
S. chittagong		E4	XIII		10	5320				
				20		730	1000			
				45		1650				
				50						
				50						

Tab. 2. Induktion von Antikörpern gegen Schaferthyrozyten durch Lipopolysaccharide von *Salmonella R* - Mutanten und durch Lipid A. Jeder Wert gibt die Zahl der Zellen/Wilz mit Antikörpern gegen Schaferthyrozyten einer SaB-Maus an.
+ bedeutet den Tod eines Tieres

lipA = Lipid A; KDO = 2-Keto-3-desoxyoktoneäure; Pe = Phosphoryläthanolamin; hep = Heptose;
P = Phosphat; Glc = Glukose; Gal = Galatose.

Bezeichnung und Zusammensetzung des zur Immunisierung benutzten Lipopolysaccharid-Antigens:

Chemotyp Zahl der direkte Antikörper-Plaques bilden-
den Zellen/Wilz, 4 Tage nach i.p. Injektion
einer Antigendosis (μg) von:

	5-10	20-50	100-200	300-1000	2000-5000
mR60 (lipA-KDO ₃ Pe-(hep) ₂ -pentasacch) _n	330	40 80 129 190 230 323 812	253 800 + + + + +	690 1920 2153 3210 3600 3750	+ +
mR345 (lipA-KDO ₃ Pe-(hep) ₂ -tetrasacch) _n	10 75	90 845	1520 2460 2500 3750	1520 2930 1314 1055 +	
rR541 (lipA-KDO ₃ Pe-(hep) ₂ /(-Glc-Gal) _n	183		+	1520	
tM ^W (lipA-KDO ₃ Pe-(hep) ₂ -Glc) _n	187		2930		
mR5 (lipA-KDO ₃ Pe-hep ₂ -Glc) _n	193		1314	1470	
mRz1 (lipA-KDO ₃ Pe-(hep) ₂ (-Glc) _n	223		1055 +	+	

mR7 (1ipA-KDO₃pe-hep₂)_n

mR3 (lipA-KDO₃Pe-hep) n

mR595 (lipA-KDO₃Pe)_n

mR345 (lipA)

mR7 (lipA)_D

mm7 (lip) n 1^h , 100°C ,
Kontrolle: Palmitinsäur

Kontrolle: Natriumpalmitat

Kontrolle: PBS, 1 ml, nicht sterilisiert

Kontrolle: unbehandelte SaB-Mäuse

Rd ₁	30	320	1800	1190 2300 4900
Rd ₂	65		800 1280	
Re	170 260 750 5875	1920	1600	1080 1800 1890
	192	345	3350 4000 8300	3350 6920 9000
	150	440	2300 3600 4000 6600	3000 3800 5500 8240
				4560
			20 20 160 310 +	20 20 160 310 +
			5 10	5 70 +
	3, 5, 5, 10, 10, 15, 16, 35, 40, 60, 90, 93, 120, 310, 330, 350	19, 20, 26, 30, 180, 240, 310,		
	0, 0, 3, 5, 5, 5, 5, 10, 65, 65, 80, 90, 150, 240	13, 15, 15, 38,		

Die Verallgemeinerung liegt nahe, daß alle LPS der Enterobakterien Antikörper gegen SE induzieren. Um dies zu überprüfen, wurden die LPS einer Anzahl weiterer Enterobakterienstämme untersucht (Tab. 1, 2).

Mäuse des Koloniezuchtstammes SaB wurden i.p. mit LPS immunisiert. Nach 4 Tagen wurde mit dem direkten Antikörper-Plaue-Test die Zahl der Zellen/Milz bestimmt, die Antikörper gegen SE bilden.

Die Milz unbehandelter Sab-Mäuse enthielt 45 ± 64 PbZ/Milz (arithmetisches Mittel $\pm$ Standardabweichung) mit Antikörpern gegen SE. Die gefundenen Extremwerte waren 0 und 240 bei 18 untersuchten Mäusen (Tab. 2). Nach Injektion von 1 ml nicht pyrogenfrei zubereiteter PBS wurde der geringfügig höhere Wert 101 ± 121 PbZ/Milz gefunden (Extremwertbereich: 3 bis 350 PbZ/Milz, bei 23 untersuchten Tieren; Tab. 2). Jedoch stieg die Zahl der PbZ/Milz nach der Injektion der LPS vieler Enterobakterienstämme zum Teil beträchtlich an (Tab. 1). Auch die LPS aller untersuchten R-Formen bewirkten eine Erhöhung der PbZ/Milz (Tab. 2).

Offenbar enthalten die LPS aller Enterobakterien eine Antigendeterminante, die mit SE kreuzreagiert, die nicht im spezifischen Polysaccharidteil enthalten ist, sondern in der allen Enterobakterien gemeinsamen KDO-Lipid A-Struktur der LPS-Moleküle gelegen ist. Es konnte keine Korrelation zwischen der Zahl der PbZ/Milz und den Serotypen der spezifischen Polysaccharidteile der LPS gefunden werden (Tab. 1, 2). Insbesondere war keine Korrelation ersichtlich mit dem Serofaktor 5 des Serotyps B, von dem bekannt ist, daß er sogenannte Forssman-Antikörper gegen SE (35) induziert (Tab. 1).

In Tab. 3 sind alle Bakterienstämme zusammengestellt (Literaturangaben und eigene Ergebnisse), bei denen bisher die Fähigkeit zur Induktion von PbZ mit Antikörpern gegen SE gefunden worden ist. Aus dieser Übersicht geht hervor, daß nicht nur alle untersuchten Stämme der Familie der Enterobacteriaceae den Antikörper auslösen können, sondern darüber hinaus noch Mitglieder anderer Familien, zumindest der Familie der Brucellaceae.

Tab. 3: Bakterienstämme, die zum vermehrten Auftreten von Zellen mit Antikörpern gegen Schaferythrozyten in der Milz von Mäusen führen.

Klassifizierung der Bakterien nach Bergey's Manual (4)

I. Protophyta

Klasse II. Schizomyzetae

Ordnung IV. Eubacteriales

Familie IV. Enterobacteriaceae

Stamm I. Escherichiae

Genus I. Escherichia

Untersucher:

Art: 1. E. c. K12 Hfr	eigene Ergebnisse
" " 08 K42	" "
" " 09 K30	" "
" " 0111 K58	" "
" " 0127	" " (und 56)
" " 0141 K85	" "

Genus II. Aerobacter

Art: 1. Aerobacter aerogenes (56, 7)

Stamm III. Serratiae

Genus VII. Serratia

Art: 1. Serratia marcescens (3, 18, 43)

Stamm V. Salmonelleae

Genus IX. Salmonella

Art: S. abortus equi	(43, 16, 17, 19-21)
" schleissheim	(51)
" typhimurium	eigene Ergebnisse
" cholerae suis	" "
" typhi, paratyphi	(33)
" strasbourg	eigene Ergebnisse
" anatum	" "
" newington	" "
" illinois	" "

S. chittagong	(51)
" senftenberg	eigene Ergebnisse
" rubislaw	(51)
" poona	eigene Ergebnisse
" kirkee	" "
" siegburg	(51)
" ghana	(51)
" minnesota	(51)
" godesberg	eigene Ergebnisse
" adelaide	" "
" milwaukee	(51)
" uhlenhorst	eigene Ergebnisse
" bergen	" "
" hisingen	" "
" basel	" "

Genus X. Shigella

Art: 1. Shig. dysenteriae (22)

Shig. sonnei (Phase II) eigene Ergebnisse

Familie V. Brucellaceae

Genus II. Bordetella

Art: 1. Bordetella pertussis (16)

2. Lipid A induziert Antikörper gegen Schaferythrozyten

Brucella abortus-Bakterien enthalten kein Lipid A, gemessen am Fehlen der β -Hydroxymyristinsäure (2). Im Gegensatz zu den LPS der Enterobakterien induziert ein Boivin-Extrakt aus Brucella abortus keine Anti-SE-PbZ. Bordetella pertussis-Bakterien, die mit Brucella abortus verwandt sind (Tab. 3) und zur gemeinsamen taxonomischen Familie der Brucellaceae gehören, enthalten Lipid A und lösen PbZ mit Antikörpern gegen SE aus (16).

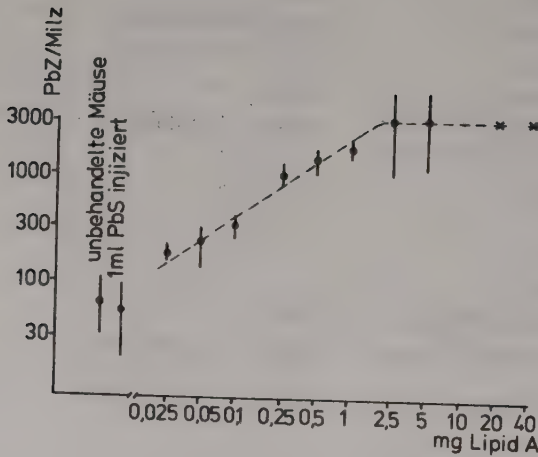


Abb. 1. Abhängigkeit der Zahl der Zellen, die Antikörper gegen Schaefer erythrocyten bilden, von der Lipid A-Dosis. Mäuse des Inzuchtstammes C3H/DiSn wurden 4 Tage nach i.p. Injektion von 1 ml Lipid A-Suspension getestet. Ein Punkt stellt das Ergebnis von 4 vereinigten Milzen dar. Die senkrechten Striche geben den Extremwertbereich aus 6 Bestimmungen an.
+ bedeutet den Tod der Tiere infolge Endotoxinwirkung.

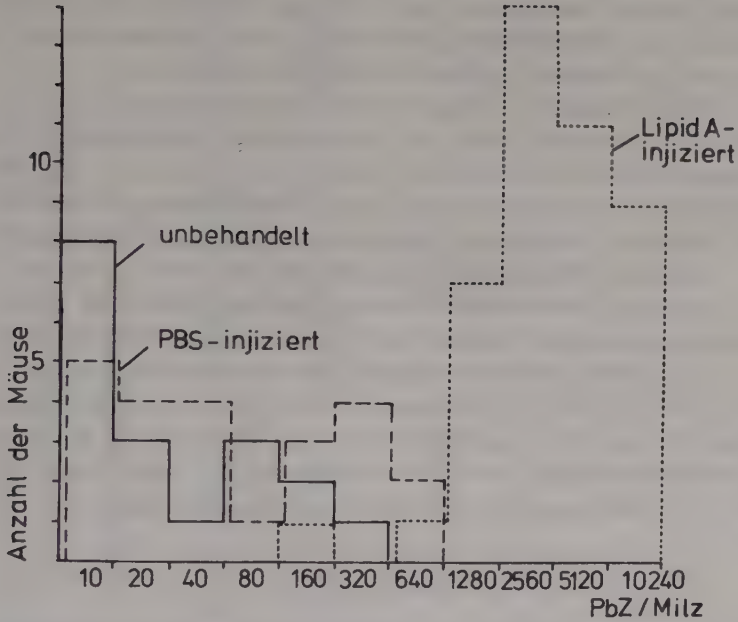


Abb. 2. Verteilung der Zahl der Zellen/Milz mit Antikörpern gegen Schafererythrozyten in einer Population Kolonie-gezüchteter Mäuse des Stammes SaB. Die Tiere wurden entweder unbehandelt oder 4 Tage nach i.p. Injektion von 1 ml nicht sterilisierten PBS-Puffers oder 4 Tage nach i.p. Injektion von 2,5 mg Lipid A (aus mR345-Bakterien, suspendiert in 1ml PBS) untersucht. Die Zahl 10 in der Abszisse bedeutet 0 bis 10, die Zahl 20 bedeutet 10 bis 20 u.s.w.

Diese Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Lipid A und der Fähigkeit, Antikörper gegen SE auszulösen, legt den Schluß nahe, daß Lipid A die Determinante der LPS-Moleküle ist, die mit SE kreuzreagiert. In der Tat bewirkt die Injektion von Lipid A bei Mäusen das Auftreten von PbZ mit Antikörpern gegen SE. Im Folgenden werden die quantitativen Bedingungen für das Auftreten dieses Antikörpers untersucht.

Abb. 1 stellt die Dosis-Wirkungs-Kurve der Lipid A-induzierten Antikörperbildung dar. Die minimal erforderliche Antigen-Menge für eine eindeutige Antikörper-Bildung war 0,1 mg. Eine Erhöhung der Antigen-Dosis über 2,5 mg hinaus führte zu keiner weiteren Zunahme der Immunantwort (Antigen-Sättigung).

Abb. 2. zeigt die Verteilung der Zahl der PbZ/Milz in einer Population Kolonie-gezüchteter SaB-Mäuse, 4 Tage nach Injektion einer Lipid A-Dosis aus dem Sättigungsbereich (2,5 mg).

Bei diesen Bedingungen war das arithmetische Mittel der PbZ/Milz 2658 ± 1887 (Extremwertbereich: 130 bis 9000 PbZ/Milz, bestimmt bei 42 Mäusen). Dieser Wert lag ungefähr 60 mal über dem mittleren Spiegel an PbZ in unbehandelten Tieren oder ca. 25 mal über dem Spiegel PBS-behandelter Kontrollmäuse.

3. Der Lipid A-induzierte Antikörper reagiert mit Erythrozyten mehrer Tierspezies

Der Antikörper, den Lipid A oder Lipid A im LPS von mR345-Bakterien induziert, ist nicht nur gegen Erythrozyten von Schafen, sondern auch von Pferden, Ziegen, Kaninchen und Rindern gerichtet (Tab. 4).

Ziegen-Erythrozyten sind für den Antikörper-Plaques-Test zum Nachweis des Lipid A-induzierten Antikörpers besonders geeignet, weil sie zu besonders klaren, jedoch etwas kleineren Plaques führen.

Die geringe Anzahl an PbZ im Test mit Erythrozyten von Hamster, Katze, Hund, Meerschweinchen und Maus kann durch die

Tab. 4. Kreuzreaktion von Lipopolysaccharid- und Lipid A-induzierten Antikörpern mit Erythrozyten verschiedener Spezies. Jede Zahl bedeutet das arithmetische Mittel aus 3 Sub-Mäusen.

x = Antikörper-Plaque-Test mit Kaninchen-Komplement

Zahl der direkte Antikörper-Plaques bildenden Zellen/Milz,
4 Tage nach i.p. Injektion von Lipopolysaccharid oder
Lipid A aus Salmonella R-Mutanten:

Für den Antikörper-Plaque-Test verwendete Erythrozyten von:	0,5 mg Lipopolysaccharid aus mR345-Bakterien	2,5 mg Lipid A aus mR7-Bakterien:	1 ml PBS (Kontrolle)
Pferd	3547		35
Schaf	2147	4140	29
Ziege	2855	1993	59
Kaninchen	2381	3593	697
Rind	997	1592	41
Syrischer Goldhamster	317		0
Katze	317		6
Hund	57		19
Meerschweinchen ^x	13		0
Ratte (Stamm: Wistar)	0		0
Maus (Stamm: SaB)	0		0

Resistenz der Zellen dieser Spezies gegen die hämolysierende Wirkung des Meerschweinchen-Komplements erklärt werden. Es ist deshalb möglich, daß der Lipid A-induzierte Antikörper trotz der geringen Hämolyserate mit den roten Blutkörperchen dieser Spezies reagiert.

4. Kinetik des Auftretens des Lipid A-induzierten Antikörpers

Die Antikörper, die man am frühesten nach Injektion eines Antigens finden kann, gehören gewöhnlich zur Klasse der IgM-(19S-)Antikörper. Die meisten IgM-Antikörper-bildenden Zellen findet man in der Milz am 4. oder 5. Tag nach Immunisierung. Erst danach treten Zellen mit IgG-Antikörpern oder mit Antikörpern anderer Klassen auf (12).

Daß es einen noch früheren Antikörper gibt, läßt sich aus Nebenfunden von Schwarz und Braun (56) und Finger et al. (16, 17) ableiten.

Schwarz und Braun immunisierten bei Untersuchungen zur Antikörperbildung gegen Bakterien AKR-Mäuse mit E.c. O 127-Bakterien. Der Antikörpernachweis erfolgte mit LPS-sensibilisierten SE. Beim Kontrollexperiment mit unsensibilisierten SE zeigten sich Anti-SE-PbZ mit einem Maximum am 3. Tag.

Finger et al. studierten den Adjuvans-Effekt von Endotoxin auf die durch SE induzierte Antikörperbildung und injizierten bei Kontrollversuchen NMRI-Mäusen LPS von *S. typhi* und *Serratia marcescens*. Am 3. Tag nach Antigen-Injektion trat ein Maximum an PbZ/Milz mit Antikörpern gegen SE auf.

Wie wir heute wissen (51), sind diese Anti-SE-PbZ auf die Lipid A-Komponente der Bakterien oder der LPS zurückzuführen.

Um sicherzustellen, daß die Lipid A-induzierten Antikörper die frühesten nach Antigen-Injektion auftretenden Antikörper sind, wurde die Kinetik des Auftretens der Anti-SE-PbZ nach Immunisierung mit LPS oder Lipid A bestimmt (Abb. 3, 4, 5).

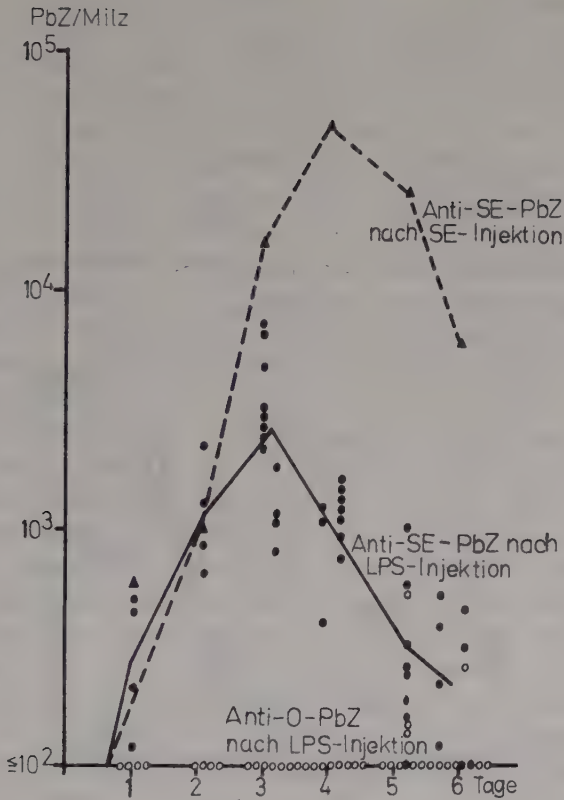


Abb. 3. Die Lipopolysaccharid-induzierte Antikörperbildung gegen SE tritt vor der durch SE induzierten IgM-Antikörperbildung gegen SE auf.

SaB-Mäuse wurden mit $20 \mu\text{g}$ *S. typhimurium*-LPS oder mit $2 \cdot 10^9$ SE i.p. immunisiert. Punkte und Kreise entsprechen dem Wert je einer Maus. Ein Dreieck stellt den Mittelwert der Ergebnisse von 5 Mäusen dar. Es wurde versucht, die Anti-O-Antikörper mit *S. typhimurium*-LPS-sensibilisierten SE nachzuweisen. Mit dem Objektträgeragglutinationstest und einem Anti-S.-Faktor-4 Serum sowie Kontrollseren war vorher sichergestellt worden, daß die SE tatsächlich spezifisch sensibilisiert worden waren.

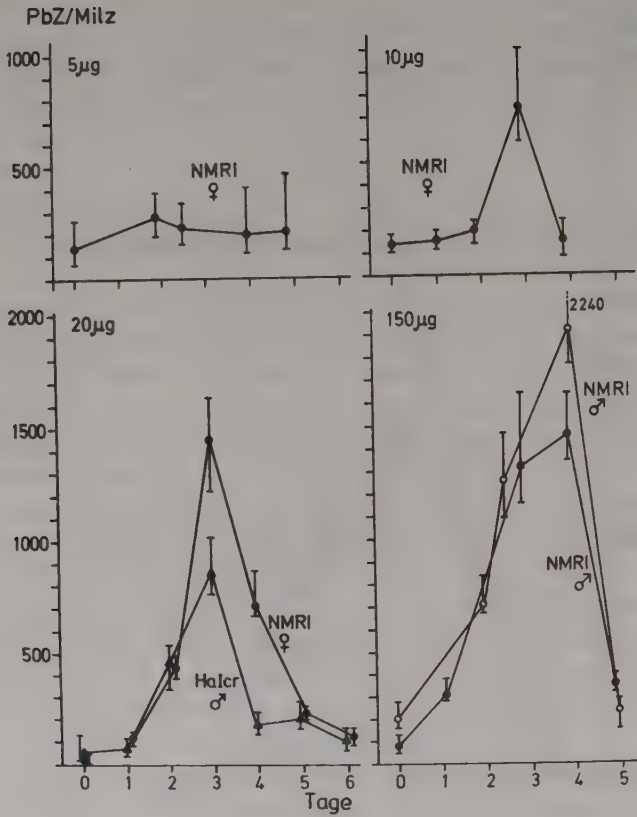


Abb. 4. Abhängigkeit der Kinetik des Auftretens von Zellen, die Antikörper gegen Schaferythrozyten bilden, von der Lipopolysaccharid-Dosis. Die NMRI/Mb-Mäuse wurden mit 20 µg *Salmonella strasbourg*-LPS und die HaIcr-Mäuse mit 20 µg *Salmonella newington*-LPS immunisiert. Jeder Punkt bedeutet das arithmetische Mittel der Werte von 6 Tieren.

In Abb. 3 ist die Kinetik des Auftretens der Anti-SE-PbZ nach Immunisierung mit SE dargestellt. Sie zeigt den bekannten IgM-Gipfel am 4. Tag. Immunisiert man jedoch mit LPS von *S. typhimurium*, so tritt der Gipfel der Anti-SE-PbZ bereits am 3. Tag auf. In der Zeit vom 3. bis zum 4. Tag fällt die Immunantwort nach LPS-Injektion bereits wieder ab. Im gleichen Zeitraum steigt aber die IgM-Antikörperbildung nach Injektion von SE noch an.

Bemerkenswert ist, daß Mäuse die durch die Lipid A-Komponente des LPS von *S. typhimurium* hervorgerufene Immunantwort zeigen, obwohl sie zur Antikörperbildung gegen andere Determinanten am gleichen Molekül (O-Determinanten) nicht in der Lage sind (Abb. 3).

Untersucht man die Abhängigkeit der Kinetik von der Antigen-Dosis (Abb. 4), so findet man bei kleinen LPS-Dosen von 10 oder 20 Mikrogramm den frühen Gipfel der Lipid A-induzierten Immunantwort am Tag 3. Erhöht man die Dosis auf 150 Mikrogramm, so tritt der Gipfel erst am 4. Tag auf. Jedoch fällt die Immunantwort auch bei der hohen Dosis nach dem Gipfelwert sehr schnell ab, viel schneller als bei den bekannten IgM-Antikörpern (vgl. Abb. 3 mit Abb. 4).

Die Verschiebung des Gipfels auf einen späteren Zeitpunkt durch Erhöhung der Antigen-Dosis ist eine Besonderheit der Lipid A-haltigen LPS-Antigene. Die Erhöhung der Dosis führt nämlich bei anderen Antigenen, z.B. SE, zu einem früheren Auftreten des Gipfels (36).

Nach Injektion von reinem Lipid A tritt der frühe Gipfel am 3. Tag ebenfalls auf, obwohl Lipid A wesentlich schlechter löslich als LPS ist (Abb. 5). Möglicherweise gibt es noch einen 2. niedrigeren Gipfel der Antikörperbildung am 6. oder 7. Tag nach Lipid A-Injektion (Abb. 5).

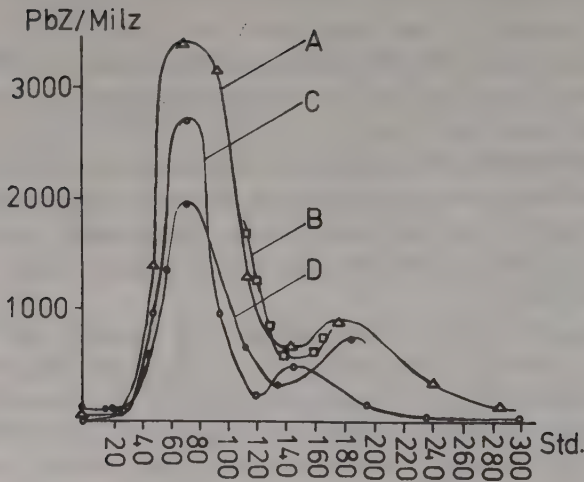


Abb. 5. Kinetik des Auftretens von Zellen mit Antikörpern gegen Schaferythrozyten in der Milz von Mäusen nach Immunisierung mit 1 mg Lipid A. Ein Wert gibt das arithmetische Mittel aus 4 Bestimmungen der vereinigten Milzen von mindestens 3 Tieren an.

A, B: Weibliche NMRI-Mäuse mit Lipid A aus *Escherichia coli* K12 Hfr-Bakterien

C: Weibliche HaIcr-Mäuse mit Lipid A aus *Escherichia coli* K12 Hfr-Bakterien

D: Männliche C3H-Mäuse mit Lipid A aus *S. minnesota* R345-Bakterien. Ein Wert stammt von den vereinigten Milzen je einer Maus der folgenden Stämme: C3H.SW, C3H/HeNIcr, C3HeBFe/J, C3H/DiSn, C3H/HeJHan.

Tab. 5. Induktion von PbZ mit Antikörpern gegen Schafer erythrozyten bei verschiedenen Mäusestämmen, 4 Tage nach i.p. Injektion von 1 bis 2,5 mg Lipid A

x: Nicht ingezüchtete Mäusestämme (Koloniezucht)

§: Koisogene Mäusestämme

Mäusestamm	Kontrollen: unbehandelt oder Injektion von 1 ml PBS			Versuch: Lipid A-Injektion		
	Anzahl der Tiere	Arithmetisches Mittel der PbZ/Milz	gefundene Extremwerte der PbZ/Milz	Anzahl der Tiere	Arithmetisches Mittel der PbZ/Milz	gefundene Extremwerte der PbZ/Milz
A/J						
A/HeJ				3	1331	1275-1365
AKR/J	1	35		7	1350	825-3080
AKR.M §)	1	110		3	925	690-1205
Balb/cJ				2	1298	1180-1415
Balb/c/Bom-nu/nu §)	2	10	0- 20	10	1359	485-2580
B10.BR/SgSn §)	1	35		4	1438	505-2410
CBA/H/J-T6/T6	1	65		3	555	550- 560
CBA/J	1	40		3	2440	2040-2965
C57Bl/6J	1	40		19	2202	295-6780
C57Bl/10Sn	9	85	16- 410	45	1260	287-3270
C3H/DiSn	1	30		3	640	525- 740
C3HeB/FeJ	1	50		10	1175	477-2620
C3H/HeJ/Han				4	1129	900-1425
C3H/HeJ	27	83	10- 260	9	869	300-1680
				51	115	0- 776
C3H/HeJ--ho-like/ho-like				2	213	85- 340

5	182	30- 470	11	1307	593-2495
C3H/HeKp			11	1307	
C3H/HeKp.RV §)			11	1160	430-2650
C3H/HeN1cr			17	1250	160-2858
C3H/HeR1			12	1079	330-2190
C3H.NB } }			7	1391	535-2490
C3H.SW } }			8	1965	913-2990
DBA/1J	18	0- 35	6	933	410-1220
DBA/2J	60		10	1519	600-3760
DBA/2An1cr	41	17- 97	10	689	335-1343
DE/J			3	714	490-1140
F/ST	15	5- 25	4	659	80-1110
Ha1cr x)			5	2589	1120-3710
I/LnJ			2	2263	1935-2590
N/ST	20		2	1855	1745-1965
NMRI/Mb x)	22	3- 108	10	2786	1275-4470
NZB/BLN	1		2	4820	4420-5220
NZW/Lac	170		2	2900	2725-3075
R III/2J	40		3	1573	1305-1825
Sab x)	44	0- 240	24	2658	130-9000
SJL/J	20		4	606	440-845

Kapitel II. Ein Genort der Maus kontrolliert die durch Lipid A induzierten Reaktionen Antikörperbildung, Entzündung, Körpertemperaturabfall und letale toxische Reaktion

1. Der Mäuse-Inzucht-Stamm C3H/HeJ kann keine Antikörper nach Lipid A-Injektion bilden

Bei der Suche nach Unterschieden der Fähigkeit, Antikörper einer bestimmten Spezifität zu bilden, immunisierte ich eine Reihe von Mäusestämmen mit Lipid A (Tab. 5). 34 der untersuchten Mäusestämmen konnten mit Lipid A zu einer Antikörperbildung gegen SE stimuliert werden. Bei dem Inzuchtstamm C3H/HeJ jedoch fiel auf, daß bei der gleichen Immunisierung kein Anstieg der Zahl der PbZ gegenüber unimmunisierten Tieren nachweisbar war.

Selbst mit sehr hohen oder sehr niedrigen Lipid A-Dosen war es unmöglich, in dem besonderen Mäusestamm eine Antikörperbildung auszulösen (Abb. 6). Auch nach Injektion von Lipid A in Form von LPS traten in den C3H/HeJ-Mäusen keine Lipid A-abhängigen Antikörper auf (Abb. 7). Ebenfalls konnte durch sehr niedrige oder sehr hohe LPS-Dosen keine Antikörperbildung gegen SE induziert werden.

Im Gegensatz zur Unfähigkeit der C3H/HeJ-Mäuse nach Lipid A Antikörper zu bilden, konnten sie Antikörper gegen SE nach Immunisierung mit SE bilden (Tab. 6). Auch konnte dieser besondere Mäusestamm Antikörper gegen O-Determinanten von LPS-Molekülen bilden, obwohl er durch die Lipid A-Determinante derselben Moleküle nicht zur Antikörperbildung stimuliert wurde (Abb. 7).

Der Immundefekt betrifft offenbar nicht alle Antigene und Antikörper, sondern ist spezifisch für die durch Lipid A-induzierten Antikörper gegen SE.

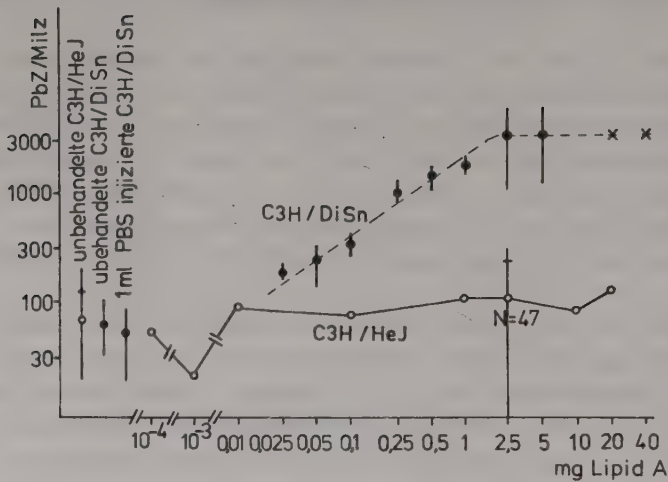


Abb. 6. Abhängigkeit der Zahl der PbZ/Milz, die Antikörper gegen SE bilden, von der Lipid A-Dosis. Bei dem Stamm C3H/HeJ entspricht 1 Ringzeichen einer Maus. Der Wert bei 2,5 mg stellt das arithmetische Mittel $\pm$ Standardabweichung und die gefundenen Extremwerte aus 47 Mäusen dar. Weitere Einzelheiten: siehe Abb. 1.

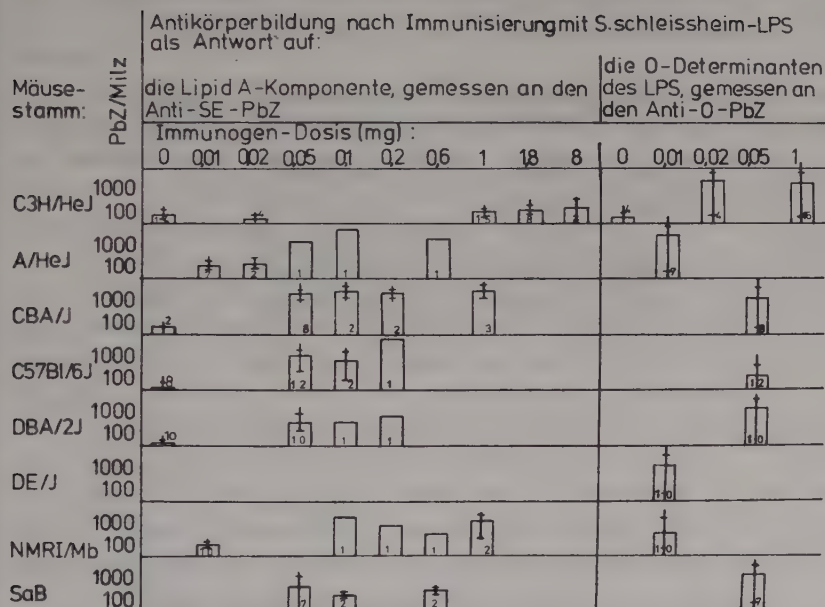


Abb. 7. Nach Injektion von S. schleissheim-LPS betrifft der Immundefekt der C3H/HeJ-Mäuse nur die durch die Lipid A-Komponente, jedoch nicht die durch die O-Determinanten derselben Moleküle induzierten Antikörper. Die PbZ/Milz wurden 4 Tage nach Immunisierung bestimmt. Die Säulen geben das arithmetische Mittel der angegebenen Tierzahlen an. Die senkrechten Linien markieren den Extremwertbereich, die Querstriche die Standardabweichung. Wo die Angabe der Standardabweichung fehlt, liegt diese außerhalb des Skalenbereiches.

Tab. 6. Vergleich von Mäusestämmen bezüglich der Fähigkeit, Antikörper gegen SE nach Immunisierung mit SE zu bilden.

Anti-SE-PbZ/Milz, 4 Tage nach i.p. Immunisierung
mit 2×10^9 SE

Mäuse- stamm	Arithmet. Mittel	$\pm$	Standard- abweichung	gefundene Extremwerte	Anzahl der Tiere
C57B1/6J	6041	$\pm$	9485	320-29307	8
CBA/J	10601	$\pm$	5002	5600-16800	4
C3H/HeJ	14764	$\pm$	12564	6827-44000	8
DBA/2J	20640	$\pm$	6562	16000-25280	2
NMRI/Mb	65000	$\pm$	2828	63000-67000	2

2. Identifizierung eines Mendelschen Genorts (Ir-4) für das Auftreten von Antikörpern nach Lipid A-Injektion

Um sicherzustellen, daß die Unfähigkeit der C3H/HeJ-Mäuse, Antikörper nach Lipid A zu bilden, nicht auf Umweltfaktoren beruht sondern vererbt wird, wurden Kreuzungsexperimente durchgeführt.

Alle weiblichen wie männlichen Nachkommen aus dem immundefekten Inzuchtstamm C3H/HeJ waren wiederum immundefekt. Dagegen konnten alle Nachkommen aus dem intakten Inzuchtstamm C57Bl/6J Antikörper bilden (Tab. 7). Es war ebenfalls kein Geschlechtsunterschied feststellbar.

Die Nachkommen aus Kreuzungen von fähigen mit unfähigen Mäusen konnten Antikörper bilden (Tab. 8). Dabei zeigte sich wiederum kein Geschlechtsunterschied. Auch spielte es keine Rolle, ob die Mutter oder der Vater den unfähigen Elternteil darstellen.

Die Höhe der Immunantwort der meisten F1-Tiere entsprach ungefähr jener der fähigen Elternstämme.

Von 63 untersuchten Tieren der F2-Generation waren 74,6 % zur Antikörperbildung fähig und 25,4 % unfähig (Abb. 8). Dieses Ergebnis kommt den zu erwartenden Prozentzahlen von 75 % bzw. 25 % für einen Mendelschen Genort sehr nahe.

Bei der Rückkreuzung von F1-Hybriden mit reinrassigen C3H/HeJ-Mäusen waren von 40 untersuchten Tieren 52,5 % unfähig und 47,5 % fähig zur Antikörperbildung. Dieser Befund entspricht ebenfalls weitgehend den Erwartungswerten von 50 % bzw. 50 % für eine genetische Kontrolle durch einen Genort.

Um zu zeigen, daß diese Prozentsätze nicht zufällig aufgetreten waren, sondern einem stabilen Erbgang zuzuschreiben sind, wurde bei Mäusen der F2-Generation nach Immunisierung mit Lipid A operativ die Milz entnommen und die entstandene Wunde vernäht. Bei diesen Milzen wurde der Gehalt an PbZ bestimmt.

Von den Tieren, die keine Antikörper gebildet hatten, wurden zwei Pärchen angesetzt. Alle ihre Nachkommen (Generation F3) konnten keine Antikörper bilden (Abb. 8). Die Nachkommen

Tab. 7. Vererbung der Fähigkeit bzw. Unfähigkeit, Antikörper gegen SE nach Lipid A-Injektion zu bilden. Eine Zahl repräsentiert ein Tier.

Inzuchtstamm	Geschlecht	PbZ/Milz 4 Tage nach i.p. Injektion von 2,5 mg Lipid A
C3H/HeJ (Nachkommen von 8 Paaren, die in 6 unabhängigen Experimenten un- tersucht wurden)	Weibchen	170, 160, 160, 145, 110, 111, 100,
	Männchen	140, 120, 40, 30, 5,
C57Bl/6J (8 Paare, 6 Experimente)	Weibchen	2500, 2100,
	Männchen	2400, 2300, 2200, 2000, 2000 1800, 1800, 1800, 1600, 800,

(F3) von zwei anderen Pärchen der F2-Generation, die Antikörper gebildet hatten, waren alle zur Antikörperbildung fähig.

Nicht nur die F1-Generation aus einer Kreuzung von unfähigen C3H/HeJ- mit fähigen C57Bl/6J-Mäusen war zur Antikörperbildung fähig, sondern auch die Kreuzungen der unfähigen Mäuse mit mehreren anderen fähigen Mäusestämmen (Tab. 8).

Es bestand keine Korrelation zwischen dem Geschlecht und der Fähigkeit, Antikörper zu bilden (Tab. 7, 8). Dieser Befund schließt aber nicht aus, daß der Genort auf dem Geschlechtschromosomenabschnitt liegt, den X- und Y-Chromosom gemeinsam haben.

Daß die Fähigkeit, Lipid A-induzierte Antikörper zu bilden, nicht zytoplasmatisch vererbt wird, geht aus dem Ergebnis reziproker Kreuzung^{en} hervor (Tab. 8). Wenn die Bereitschaft, Lipid A induzierte Antikörper zu bilden, vom Zytoplasma abhinge, sollte man erwarten, daß die heterozygote F1-Generation einer homozygot positiven, weiblichen Maus z.B. vom Stamme C57Bl/6J oder DBA/2AnIcr ohne Ausnahme Antikörper bilden kann und daß die

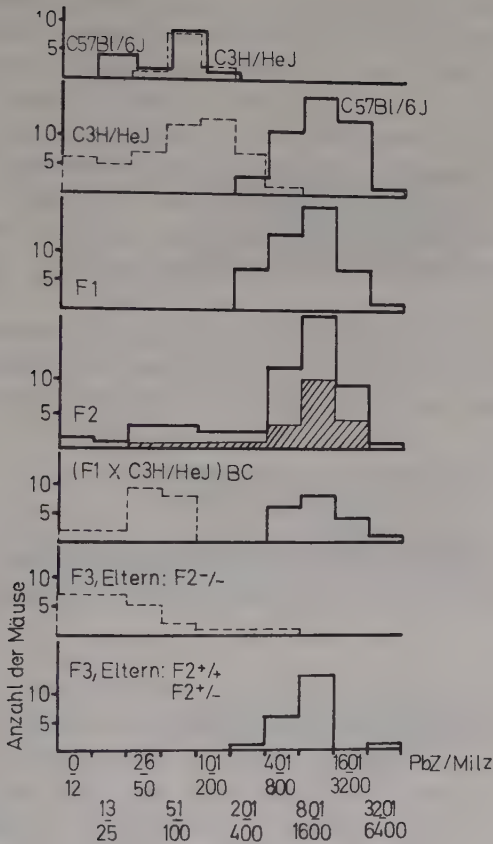


Abb. 8. Erbgang der Fähigkeit bzw. Unfähigkeit, Antikörper gegen Schaferythrozyten nach Lipid A-Injektion zu bilden. Die Zahl der PbZ/Milz wurde 4 Tage nach i.p. Injektion von 2,5 mg Lipid A bestimmt. Die bei der F2-Generation schraffiert gezeichnete Fläche stellt den Anteil der Mäuse mit schwarzem Fell (Genotyp a/a) dar. Die oberste Graphik zeigt die Ergebnisse PBS-behandelter Kontrolltiere.

Tab. 8. Induktion von PbZ mit Antikörpern gegen SE bei den F1-Generationen der Kreuzungen mehrerer Mäuse-Inzuchtstämme, 4 Tage nach i.p. Injektion von 2,5 mg Lipid A.

F1 - Generationen	Arithmetisches Mittel der PbZ/Milz	gefundene Extremwerte der PbZ/Milz	Anzahl der Tiere	Geschlecht
(C3H/HeJ x A/HeJ)F1	1078	750-1440	4	gemischt
(C3H/HeJ x CBA/J)F1	1253	770-1740	6	gemischt
(C3H/HeJ/Han x C3H/HeJ)F1	1164	720-1560	5	gemischt
(C3H/HeJ x C57BL/6J)F1	1129	233-2660	10	Weibchen
(C57BL/6J x C3H/HeJ)F1	873	280-1670	9	Männchen
	1159	233-4330	15	Weibchen
(C3H/HeJ x DE/J)F1	895	270-1836	12	Männchen
(C3H/HeJ x DBA/2AnIcr)F1	600	330-750	5	gemischt
	948	825-1070	2	Weibchen
(DBA/2AnIcr x C3H/HeJ)F1	1885	1755-2015	2	Männchen
	1583	1510-1655	2	Weibchen
	1183	1140-1225	2	Männchen
(C3H/HeJ x DBA/2J)F1	3095	1290-4900	2	gemischt

heterozygote F1-Generation einer reinerbig negativen weiblichen C3H/HeJ-Maus ausnahmslos unfähig zur Antikörperbildung ist. Die Nachkommen sowohl der positiven als auch der negativen Mütter bildeten aber Antikörper (Tab. 8).

Die Ergebnisse aller Untersuchungen über den Erbgang sprechen ausnahmslos dafür, daß die Fähigkeit zur Lipid A-induzierten Antikörperbildung vererbt wird und daß der Erbgang durch einen Mendelschen Genort bedingt ist, wobei die Fähigkeit, Antikörper zu bilden, dominant über die entsprechende Unfähigkeit ist.

Für den Genort wird die provisorische Bezeichnung Ir-L vorgeschlagen, mit den Allelen Ir-L⁺ für die Fähigkeit und Ir-L⁻ für die Unfähigkeit zur Lipid A-induzierten Antikörperbildung.

3. Eine Spontanmutation ist die Ursache der Unfähigkeit des Mäusestammes C3H/HeJ, Lipid A-induzierte Antikörper zu bilden

In verschiedenen Laboratorien der Welt werden Unterstämme (Nebenlinien) des Mäuse-Inzuchtstammes C3H/He gehalten. Alle C3H-Unterstämme wurden von der C3H/He-Stammlinie abgezweigt, als diese bereits mehr als mindestens 35 Generationen (entsprechend 99,999999997 % Homozygotie) ingezüchtet worden war. Falls keine Mutation seit der Abzweigung aufgetreten ist, sollten deshalb die Autosomen der Unterstämme gleiche Erbanlagen aufweisen.

Aus Tab. 5 geht hervor, daß die C3H-Unterstämme starke Unterschiede in ihrer Fähigkeit aufweisen, nach Lipid A Antikörper zu bilden. Von zehn untersuchten C3H-Unterstämmen konnten 8 wie alle anderen Mäusestämme nach Lipid A-Injektion Antikörper bilden. Nur die beiden Stämme C3H/HeJ und C3H/HeJ--ho-like/ho-like zeigten sich unfähig, Lipid A als Antigen zu erkennen. Der Stamm C3H/HeJ--ho-like/ho-like ist durch eine Mutation, die das Nervensystem betrifft, aus dem Stamm C3H/HeJ hervorgegangen (40).

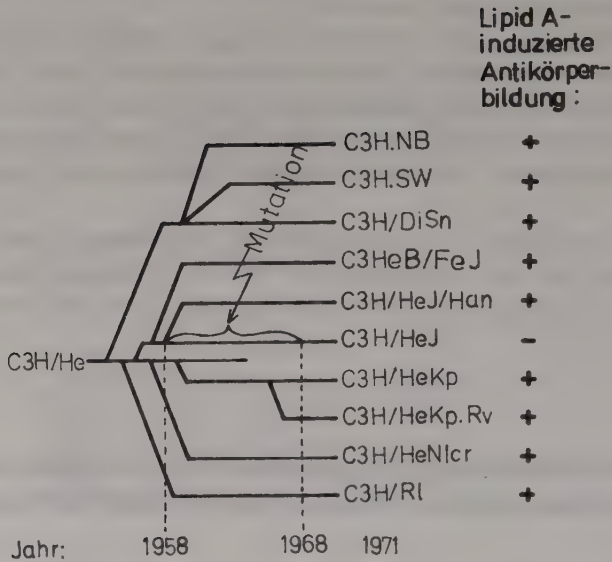


Abb. 9. Stammbaum der C3H/He-Mäuse-Unterstämme und -Nebenlinien

Aus dem Stammbaum der C3H-Unterstämme (Abb. 9) kann man ableiten, daß die beiden Mäusestämme, die keine Antikörper nach Lipid A bilden können, auf den Stamm C3H/HeJ zurückzuführen sind. Eine Nebenlinie des C3H/HeJ-Stammes, die 1958 abgezweigt wurde (C3H/HeJ/Han), kann Antikörper bilden. Ebenso können alle Stämme, die sich vor 1958 von der C3H/HeJ-Linie abgespalteten, Antikörper bilden. Es ist deshalb anzunehmen, daß um das Jahr 1958 der C3H/HeJ-Stamm, wie die Stämme, von denen er sich ableitet oder mit denen er verwandt ist, Antikörper bilden konnte und daß nach 1958 ein Ereignis im C3H/HeJ-Stamm aufgetreten ist, das dazu führte, daß alle weiteren Generationen dieses Stammes von da ab Lipid A nicht mehr als Antigen erkennen können. Ein solches Ereignis wird Mutation genannt.

4. Der Genort Ir-4 kontrolliert die Entzündungsreaktion

Die i.p. Injektion von LPS bewirkt bei Mäusen eine sehr starke Entzündungsreaktion (24). Diese Wirkung ist hauptsächlich auf die Lipid A-Komponente der LPS-Moleküle zurückzuführen, denn Lipid A wirkt auf Leukozytenkulturen chemotaktisch (55).

Es erschien deshalb denkbar, daß der Lipid A-Genort auch die Entzündungsreaktion in der Bauchhöhle nach Injektion von LPS oder Lipid A kontrolliert. In Einklang mit dieser Vorstellung steht der Befund von Sulzer (63), daß der Mäusestamm, bei dem ich die Mutation fand, eine besondere Art der Entzündungsreaktion aufweist: nach Injektion von Endotoxin zeigt dieser Stamm in der Bauchhöhle wenige neutrophile Granulozyten und viele mononukleäre Zellen.

Um den Zusammenhang zwischen dem Lipid A-Genort und der Entzündungsreaktion zu beweisen, wurden die Lymphozyten nach Heckner (32) unterteilt in Follikellymphozyten, bei denen nur der Kern sichtbar war oder zusätzlich höchstens ein geringer Plasmasaum, der den Kern nur teilweise umhüllt. Alle Lymphozyten, bei denen Plasma rings um den Kern sichtbar war, einschließlich der großen Lymphozyten wurden als Sinuslymphozyten klassifiziert.

48 Stunden nach i.p. Injektion von S. schleissheim-LPS (Abb. 10) zeigte der mutierte Mäusestamm in der Bauchhöhle die größte Menge an Monozyten + Makrophagen aller untersuchten Stämme. Er wies außerdem die wenigsten neutrophilen Granulozyten auf, eine mittlere Anzahl Follikellymphozyten, die meisten Sinuslymphozyten, sowie die meisten eosinophilen und basophilen Granulozyten.

Die vererbbar thymuslosen Mäuse des Stammes Balb/c/Bomnu/-nu konnten eine starke Entzündungsreaktion ausbilden (Abb. 10), die hauptsächlich auf Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten zurückzuführen ist. Auffallend ist aber das vollständige Fehlen der Follikellymphozyten. Daraus kann man den Schluß ziehen, daß die Follikellymphozyten mit den Thymus-(T)-abhängigen Lymphozyten identisch sind. Von diesen T-Zellen

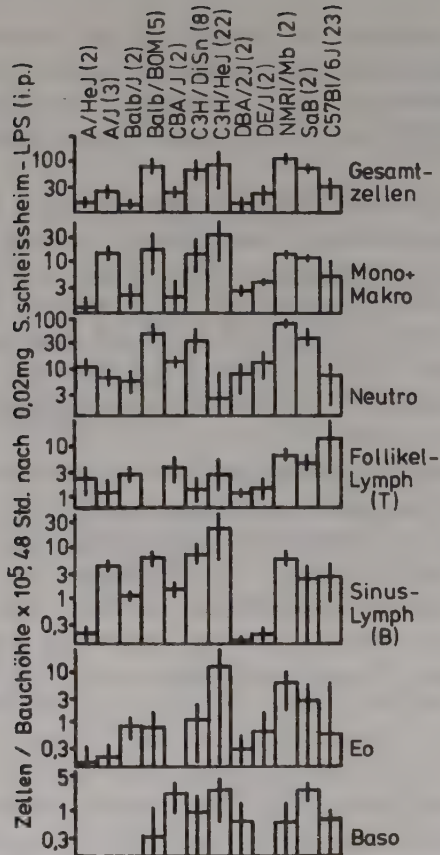


Abb. 10. Entzündungsreaktion in der Bauchhöhle von Mäusen verschiedener Stämme, 48 Stunden nach i.p. Injektion von S.schleissheim-LPS. Die Tiere des Stammes Balb/Bom sind homozygot thymuslos. Die Säulen geben das arithmetische Mittel mit der Standardabweichung aus der in Klammern gesetzten Tierzahl an.

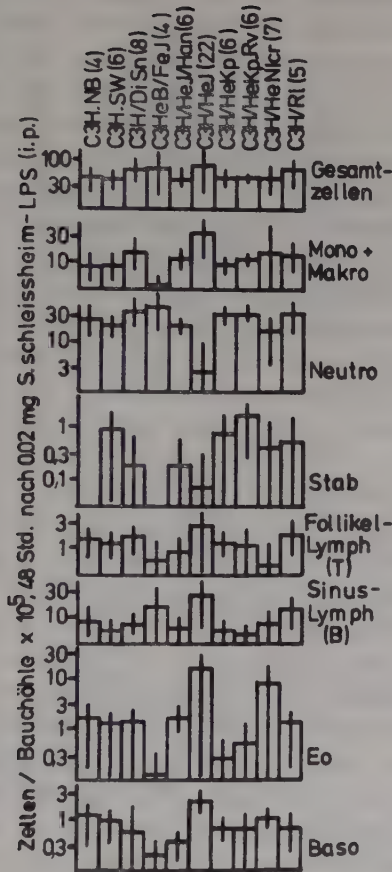


Abb. 11. Die Entzündungsreaktion in der Bauchhöhle von Unterstämmen des Mäuse-Inzuchtstammes C3H/He nach i.p. Injektion von S. schleissheim-LPS. Vgl. Abb. 10.

weist der Mäusestamm C57Bl/6J besonders viele auf (Abb. 10, 12).

Wenn man Unterstämme des C3H-Stammes vergleicht (Abb. 11), so fällt ebenfalls auf, daß der mutierte Stamm C3H/HeJ die meisten Monozyten + Makrophagen, am wenigsten neutrophile Granulozyten, die meisten Sinuslymphozyten sowie die meisten eosinophilen und basophilen Granulozyten ausbildet. Außerdem weist er die meisten Follikellymphozyten auf. Da sich diese Unterstämme vom Stamm C3H/HeJ gemeinsam nur in der Mutation unterscheiden, kann man annehmen, daß die unterschiedlichen Entzündungsreaktionen ebenfalls vom mutierten Genort kontrolliert werden.

Nach der Behandlung derselben C3H-Unterstämme mit einem anderen LPS (von *S. newington*) (Abb. 12) zeigten sich beim Mäusestamm C3H/HeJ wiederum viele Monozyten + Makrophagen, am wenigsten neutrophile Granulozyten, die meisten Follikel- und Sinuslymphozyten, sowie die meisten eosinophilen und basophilen Granulozyten.

Auch nach Injektion des Glykolipids aus *S. mR595*-Bakterien ($\text{lipA-KDO}_3\text{-Pe}$)_n (Abb. 13) traten bei den C3H/HeJ-Mäusen viele Monozyten + Makrophagen auf, sowie wenige neutrophile Granulozyten, viele Follikel- und Sinuslymphozyten und viele eosinophile und basophile Granulozyten.

Nach Lipid A-Behandlung (Abb. 14) ist die Besonderheit des C3H/HeJ-Stammes nur im Falle der neutrophilen einschließlich der stabförmigen Granulozyten eindeutig festzustellen. Bei hohen Lipid A-Dosen kann man im mutierten Mäusestamm sehr viele neutrophile Granulozyten finden. Dies zeigt, daß die verminderte Neutrophilie des C3H/HeJ-Stammes nicht auf einen Mangel an neutrophilen Granulozyten zurückgeführt werden kann.

Die Erbgänge der Entzündungsreaktion nach Injektion von *S. schleissheim*- bzw. *S. newington*-LPS sind in Abb. 16 und 17 dargestellt. Bei den Tieren der F2-Generation (Abb. 16) und der Rückkreuzung (Abb. 17) wurde zunächst die Entzündungsreaktion gemessen. Vier Wochen später wurde denselben Tieren Lipid A injiziert und nach weiteren vier Tagen die Milz zur Antikörperbestimmung operativ entfernt. Tiere mit weniger als 400 PbZ/Milz betrachtete ich als Träger des Genotyps Ir-4/- und Tiere mit mehr als 400 PbZ/Milz als Ir-4+/+ oder Ir-4+/-.

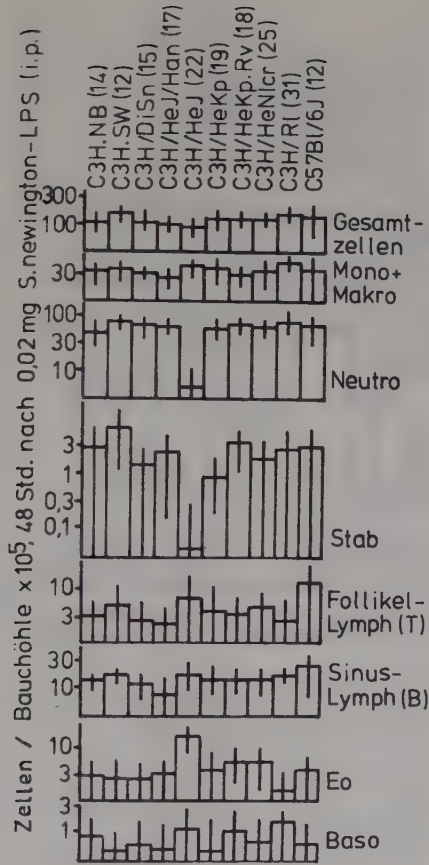


Abb. 12. Die Entzündungsreaktion in der Bauchhöhle von Unterstämmen des Mäuse-Inzuchtstammes C3H/He nach i.p. Injektion von *S. newington*-LPS. Vgl. Abb. 10.

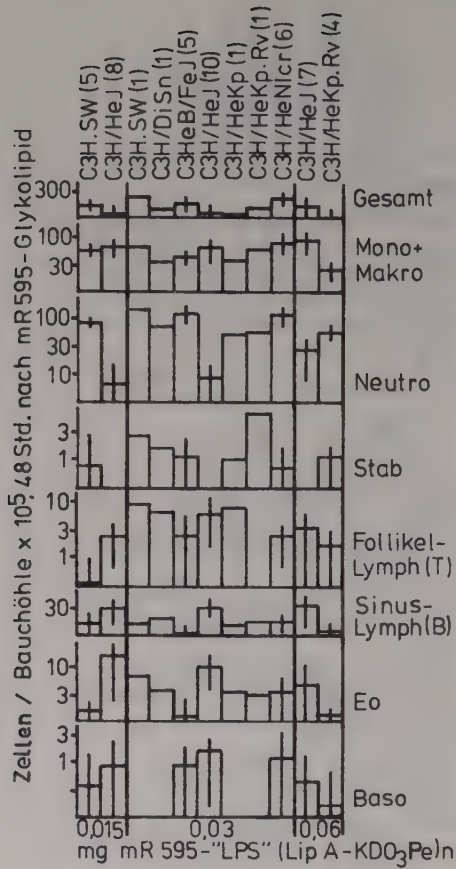


Abb. 13. Die Entzündungsreaktion in der Bauchhöhle von Unterstämmen des Mäuse-Inzuchtstammes C3H/He nach Injektion verschiedener Dosen des Glykolipids von mR595-Bakterien. Vgl. Abb. 10.

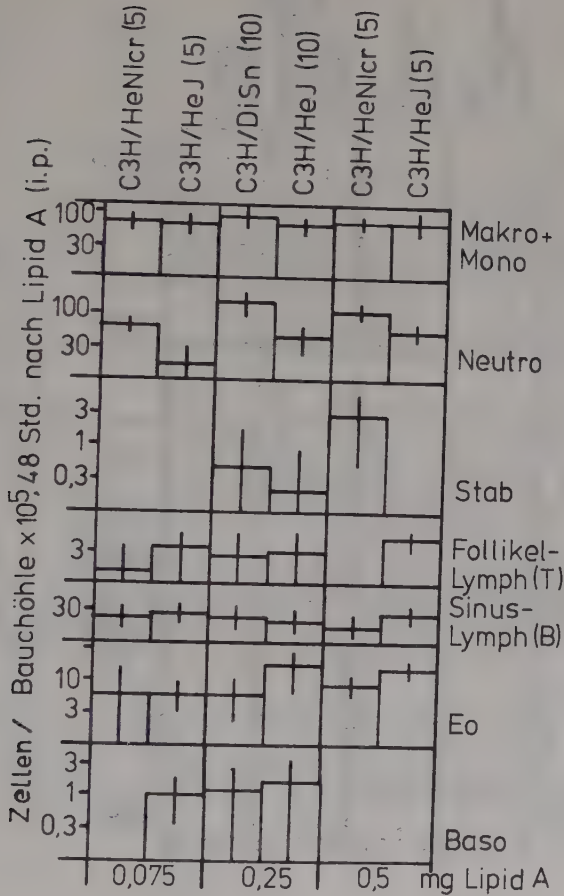


Abb. 14. Die Entzündungsreaktion in der Bauchhöhle von Unterstämmen des Mäuse-Inzuchtstammes C3H/He nach Injektion verschiedener Dosen Lipid A. Vgl. Abb. 10.

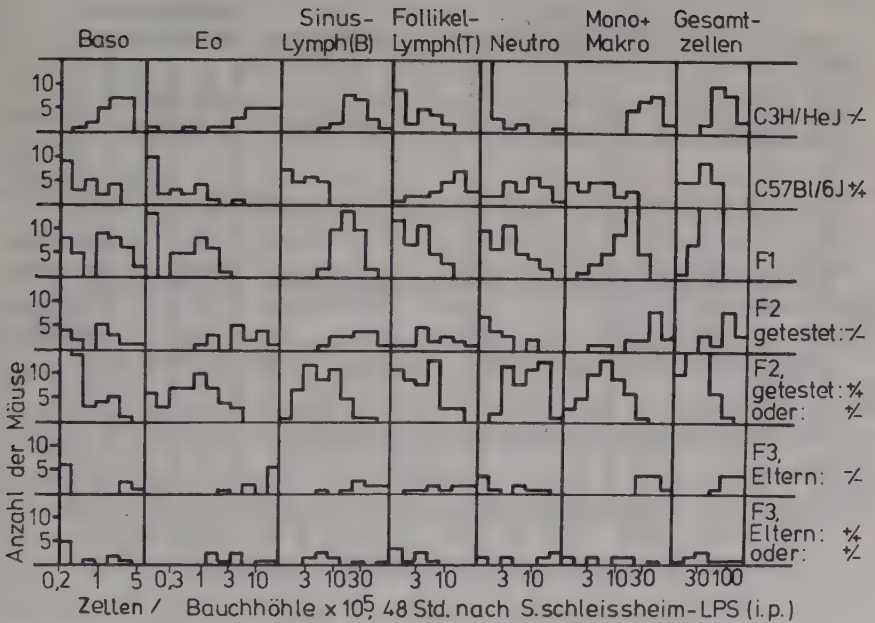


Abb. 16. Vererbung der durch S. schleissheim-LPS (0,02 mg i.p.) induzierten Entzündungsreaktion und deren Kopplung mit dem Genort Ir-4.

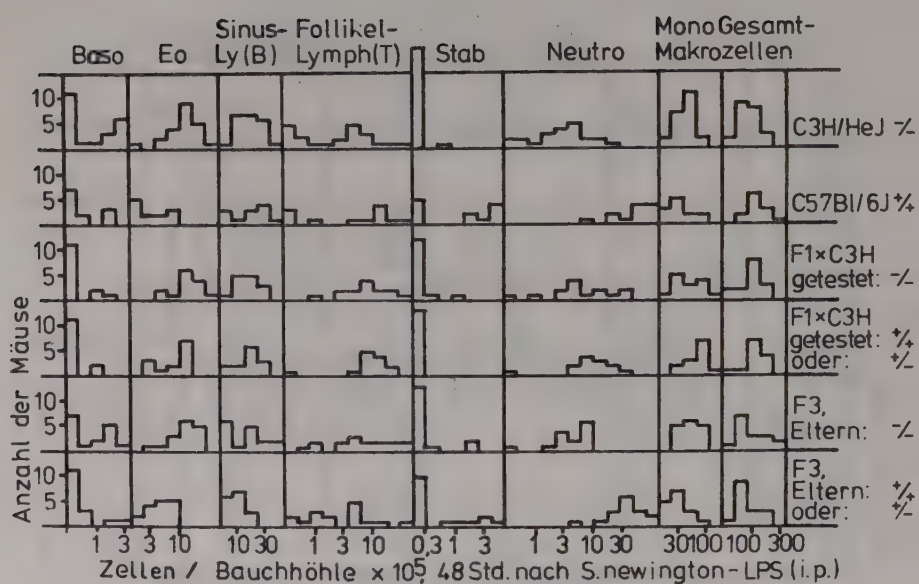


Abb. 17. Vererbung der durch *S. newington*-LPS (0,02 mg i.p.) induzierten Entzündungsreaktion und deren Kopplung mit dem Genort Ir-4.

Die Tiere der F2-Generation mit dem Genotyp -/- zeigten wie erwartet weniger neutrophile und mehr eosinophile Granulozyten als ihre Geschwister mit dem Genotypus +/- oder +/+ (Abb. 16), die zum Teil aus demselben Wurf kamen. Derselbe Trend trat auch in der F3-Generation auf und konnte auch nach Injektion eines anderen LPS (Abb. 17) bei einem Rückkreuzungsexperiment gefunden werden.

Zusammenfassend kann man die in den Abbildungen 10 bis 17 dargestellten Untersuchungen als 13 unabhängige Versuche betrachten (1.: Abb.10; 2.: Abb.11; 3.: Abb.12; 4.: Abb.13, kleine (k.) Dosis (D.); 5.: Abb.13, mittlere (m.) D.; 6.: Abb.13, große (g.) D.; 7.: Abb.14, k.D.; 8.: Abb.14, m.D.; 9.: Abb.14, g.D.; 10.: Abb.16, F2; 11.: Abb.16, F3; 12.: Abb.17, F1 x C3H; 13.: Abb.17, F3).

In allen 13 Versuchen wurde eine geringere Anzahl an neutrophilen Granulozyten in den Mäusen mit dem Genotyp Ir-L-/- gegenüber Ir-L+/+ oder Ir-L+/- gefunden. Eine erhöhte Anzahl an Follikel- und Sinuslymphozyten wurde in 10 der 13 Versuche festgestellt. Erhöhte Mengen eosinophiler bzw. basophiler Granulozyten wurden in 12 bzw. 11 der 13 Experimente beobachtet. Erhöhte Konzentrationen an Monozyten + Makrophagen traten nur in 7 der 13 Versuche auf. Bei den in Abb. 18 gewählten Versuchsbedingung wurde jedoch eine eindeutige Kopplung zwischen dem Genotyp Ir-L-/- und hohen Konzentrationen an Monozyten + Makrophagen gefunden.

Der Verlauf der Entzündungsreaktion ist in Abb. 15 dargestellt. Der Mäusestamm C3H/HeJ, bei dem man mit Lipid A keine Antikörper induzieren kann, zeigte im Vergleich zu den Lipid A-Antikörper-bildenden Stämmen in der Bauchhöhle im unbehandelten Zustand eine niedrigere Konzentration an eosinophilen Granulozyten. Nach LPS- oder Lipid A-Behandlung wurde bei diesem Vergleich beobachtet:

- a) ein Anstieg der Monozyten + Makrophagen gegenüber einem Abfall, einem Gleichbleiben oder einem geringen Anstieg,
- b) ein schwacher gegenüber einem starken Anstieg der neutrophilen Granulozyten,

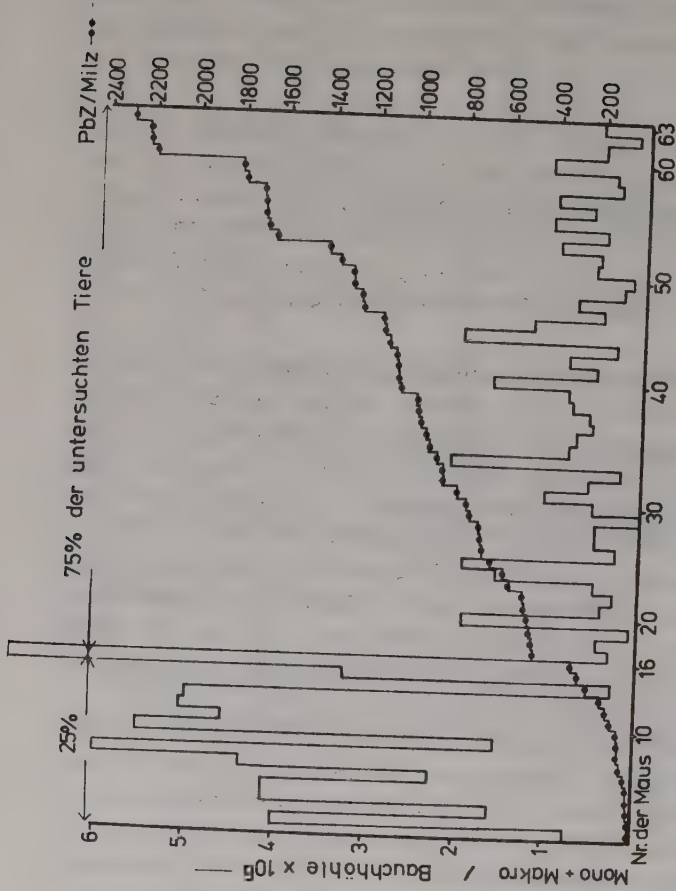


Abb. 18. Genetische Kopplung der Monozyten/Makrophagen-Reaktion mit der Fähigkeit, Lipid-A-induzierte Antikörper zu bilden. Tieren der F₂-Generation einer Kreuzung von C3H/HeJ- mit C57Bl/6J-Mäusen wurde im Alter von 2 Monaten 20 μ g S.schleissheim-LPS i.p. injiziert. Nach 48 Stunden wurde die Entzündungsreaktion in der Bauchhöhle bestimmt. 4 Wochen später erhielten dieselben Tiere i.p. 2,5 mg Lipid A. Vier Tage später wurden die Zellen mit Antikörpern gegen SE bestimmt. Die Ergebnisse der Entzündungsreaktionen sind als eine Funktion der Rangordnung der Immunantwort angetragen. Ein Punkt oder eine Säule entspricht einer Maus.

- c) ein stärkerer Anstieg der Follikellymphozyten gegenüber einem schwächeren Anstieg, oder einem Abfall,
- d) ein geringer gegenüber einem stärkeren Abfall der Sinuslymphozyten,
- e) ein starker Anstieg der eosinophilen Granulozyten gegenüber einem Gleichbleiben,
- f) ein Gleichbleiben gegenüber einem Abfall der basophilen Granulozyten.

5. Das Gen Ir-4 kontrolliert den Lipopolysaccharid-induzierten Körpertemperaturabfall

Die enterobakteriellen LPS bewirken bei Kaninchen, Pferden und Menschen eine Erhöhung der normalen Körpertemperatur. LPS sind das stärkste bekannte Pyrogen. Die Temperatur-erhöhende Wirkung ist auf die Lipid-A-Komponente zurückzuführen, weil Lipid A wie ganze LPS-Moleküle Fieber auslösen kann (43).

Ratten und Mäuse antworten auf LPS im Gegensatz zu anderen Säugetieren mit einer Hypothermie.

Lipopolysaccharide setzen bei Kaninchen hauptsächlich aus neutrophilen Granulozyten eine Substanz frei, die endogenes Pyrogen genannt wird. Dieser Stoff gelangt auf dem Blutweg in das Gehirn und bewirkt dort eine Erhöhung des Sollwertes der Körpertemperatur, wobei das Verhältnis der Freisetzung (60) von Adrenalin, Noradrenalin und 5-Hydroxytryptamin verschoben wird.

Ob die Körpertemperaturerniedrigung bei Mäusen eine Sollwerterniedrigung darstellt und durch endogenes Pyrogen bewirkt wird, ist noch unbekannt. Jedoch gibt es Hinweise für eine Beteiligung von 5-Hydroxytryptamin (60).

In den vorausgegangenen Abschnitten wurde gezeigt, daß alle bisher untersuchten, von der Lipid A-Komponente verursachten Endotoxin-Effekte vom Genort Ir-4 kontrolliert werden. Deshalb war anzunehmen, daß auch die Beeinflussung der Körpertemperatur durch Lipid A durch das Ir-4-Gen gesteuert wird.

Die Ergebnisse der Körpertemperaturmessung nach LPS-Injektion sind in Abb. 19 dargestellt. Bei unbehandelten Mäusen mehrerer Inzuchtstämme blieb die Körpertemperatur im Versuchszeitraum von 6 Stunden im Bereich der angegebenen Streuung konstant.

Nach der i.p. Injektion von 2 mg S. schleissheim-LPS trat bei Mäusestämmen mit dem Genotyp Ir-L+/+ ein Temperaturabfall ein. Beim Stamm A/HeJ war dieser Abfall ab 1 bis 2 Stunden nach LPS-Injektion am stärksten. Dieser Mäusestamm ist gleichzeitig am empfindlichsten im Hinblick auf die letal toxische Wirkung der Endotoxine (Tab. 10).

Im Gegensatz dazu blieb die Körpertemperatur von C3H/HeJ-Mäusen mit dem Genotyp Ir-L-/- unverändert.

Ähnliche Ergebnisse traten nach Injektion von S. bergensis-LPS auf (Abb. 19): die Körpertemperatur von Tieren, die Lipid A-induzierte Antikörper bilden können, fiel ab, während die Temperatur von Antikörper-negativen Tieren nicht nur konstant blieb, sondern eher noch etwas anstieg.

Da sich die C3H/He +/--Stämme vom Stamm C3H/HeJ sehr wahrscheinlich nur in den Allelen des Genorts Ir-L unterscheiden, sind die gefundenen Unterschiede bei der Wärmeregulation auch auf Allele dieses Genorts zurückzuführen.

Diese Schlußfolgerung wird noch weiter gestützt durch:
a) die Befunde bei A/HeJ- und C57Bl/6J-Mäusen (Abb. 19), deren Genotyp Ir-L+/+ ist und die mit Temperaturabfall reagierten und
b) durch zwei Mäuse der 4. Filialgeneration aus einer Kreuzung von C57Bl/6J- mit C3H/HeJ-Mäusen, bei denen die Temperatur nach i.p. Injektion von 2 mg S. newington-LPS nicht abfiel und deren Genotyp Ir-L-/- war, weil bei ihren Eltern in der operativ entfernten Milz keine Antikörper nach Lipid A gefunden worden waren. Im Kontrollversuch fielen die Temperaturen je einer C3H/DiSn- und einer C3H/HeKp.Rv-Maus, die beide den Genotyp Ir-L+/+ aufweisen, innerhalb 6 Stunden nach S. newington-LPS-Injektion um 5°C ab.

Da sich die genetische Kontrolle des Körpertemperaturabfalls auf 3 wahllos herausgegriffene Lipopolysaccharide erstreckte, kann man annehmen, daß der Temperatur-Effekt aller

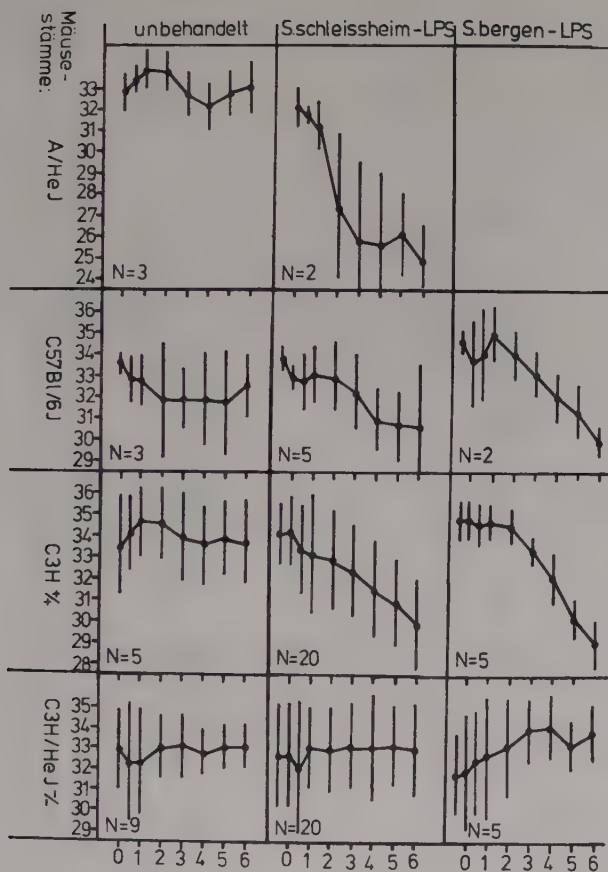


Abb. 19. Verlauf der Körpertemperatur von Mäusen nach i.p. Injektion von 2 mg LPS.

Ein Punkt stellt das arithmetische Mittel + Standardabweichung aus der angegebenen Anzahl von Mäusen dar. Die unbehandelten C3H (+/+) - Mäuse setzten sich zusammen aus 4 C3H/DiSn und 1 C3HeBFe/J, die S. schleissheim-LPS behandelten C3H (+/+) - Mäuse aus 6 C3H/HeNier, 5 C3H/DiSn, 3 C3H/HeJ/Han, 2 C3H/HeKp.RV, 2 C3H/HeKp.RV, 1 C3HeBFe/J, 1 C3H.SW, und die S. bergen-LPS behandelten C3H (+/+) - Mäuse aus 2 C3H/HeKp.RV, 2 C3H/HeNier und 1 C3H/DiSn.

Tab. 11. Letale Toxizität von Salmonella newington-LPS bei Mäusen verschiedener Stämme und Kreuzungen

Mäusestamm oder Kreuzung:	Zahl der toten Tiere/Zahl der getesteten Tiere, 72 Stunden nach i.p. Injektion einer LPS-Dosis (mg) von:					
	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
A/HeJ						
C57Bl/6J						10/10 { 100 % }
C3H/DiSn						23/27 { 85 % }
C3H.NB					0/5	7/7 { 100 % }
C3H.SW						8/8 { 100 % }
C3H/HeJ					0/10	11/11 { 100 % }
C3H/HeJ/Han						1/14 { 7 % }
C3H/HeKp						9/9 { 100 % }
C3H/HeKp.Rv				4/4	5/5	4/4 { 100 % }
C3H/HeN1cr	0/4	0/9	5/5	5/5	2/2	7/9 { 78 % }
C3H/HeR1						8/8 { 100 % }
DBA/2J						8/8 { 100 % }
(A/HeJxC3H/HeJ)F1						11/11 { 100 % }
(C3H/HeJxCBA/J)F1						3/4 { 75 % }
(C3H/HeJxCBA/2J)F1						3/3 { 100 % }
(C3H/HeJxC57Bl/6J)F1						6/6 { 100 % }
(C57Bl/6JxC3H/HeJ)F1						4/10 { 40 % }
						9/20 { 45 % }

Tab. 12. Genetische Analyse der Endotoxin-Empfindlichkeit bei Mäusen. Bei der F2-Generation und bei der Rückkreuzung (BC1) wurde der Ir-L-Phänotyp in der 4 Tage nach Stimulierung mit 2,5 mg Lipid A operativ entfernten Milz bestimmt. Tiere mit mehr bzw. weniger als 400 pbZ/Milz wurden dem Phänotyp + bzw. - zugeordnet. Die Toxizitätstestung erfolgte 4 Wochen nach der Milzentfernung.

Mäusestamm oder Kreuzung	Lipid A-Antikör- per-Phänotyp	Ir-L-Genotyp	Zahl der toten Tiere/ Zahl der getesteten Tie- re, 72 Stunden nach i.p. Injektion von 2 mg S. schleissheim-Lps	prozentualer Anteil der toten Tiere
C3H/HeJ	-	-/-	1/43	2 %
C57Bl/6J	+	+/+	15/15	100 %
(C3H/HeJxC57Bl/6J)F1	+	+/-	7/11	64 %
(C3H/HeJxC57Bl/6J)F2	-	-/-	0/15	0 %
(C3H/HeJxC57Bl/6J)F1xC3H/HeJ BC1	+	od. +/-	26/42	62 %
(C3H/HeJxC57Bl/6J)F1xC3H/HeJ BC1	-	-/-	0/14	0 %
	+	+/+	10/13	77 %

Lipid A-haltigen Lipopolysaccharide unter der Kontrolle des Genorts Ir-L steht.

6. Das Gen Ir-L kontrolliert die letale toxische Reaktion

Die letale toxische Wirkung der LPS beruht ebenso wie deren meisten anderen Wirkungen auf der Lipid A-Komponente (68). Es lag deshalb nahe, eine genetische Kontrolle der letalen toxischen Reaktion durch das Lipid A-Gen anzunehmen.

Von 18 untersuchten Mäusestämmen überlebte nur der Stamm C3H/HeJ, bei dem ich die Mutation im Lipid A-Gen gefunden hatte, Dosen von X. schleissheim-LPS, die bei anderen Mäusestämmen gewöhnlich letal sind (Tab. 10). Insbesondere ist der Stamm C3H/HeJ auch Endotoxin-resistenter als die anderen C3H-Unterstämmen, von denen er sich nur durch die Mutation unterscheidet. Dies bedeutet, daß die Endotoxin-Empfindlichkeit bzw. -Resistenz vom Genort Ir-4 kontrolliert wird.

Nach Behandlung mit einem anderen LPS, von S. newington, war der Stamm C3H/HeJ ebenfalls wesentlich resistenter als die anderen Mäusestämmen und als die C3H-Unterstämmen (Tab. 11).

Die Nachkommen aus Kreuzungen resistenter Mäuse mit empfindlichen Mäusen waren bei beiden LPS empfindlicher als die resistenten Eltern (Tab. 10, 11).

Die genetische Analyse (Tab. 12) zeigte in der F2-Generation und bei der Rückkreuzung (BC1) eine genetische Kopplung der Endotoxin-Empfindlichkeit mit der Fähigkeit, Lipid A-induzierte Antikörper zu bilden. Umgekehrt überlebten alle Tiere, die keine Antikörper bilden konnten, letale Endotoxindosen.

Bei der F1-Generation der Kreuzung von C3H/HeJ-Mäusen mit dem Stamm C57Bl/6J lag die Empfindlichkeit zwischen der der beiden Elternstämmen (intermediär, Tab. 10, 11, 12). Bei Kreuzungen mit anderen Stämmen war die Empfindlichkeit dominant (Tab. 10, 11).

Dies zeigt, daß neben dem Gen Ir-L noch weitere Gene die letale Endotoxin-Reaktion beeinflussen.

Besprechung

Für genetische Untersuchungen bei Säugetieren sind Hausmäuse die geeignetsten Objekte. Bei ihnen sind mehr als 300 Gene beschrieben, die zum Teil auf bestimmten Chromosomen lokalisiert werden konnten und deren Anordnung auf den Chromosomen aus den Rekombinationsfrequenzen teilweise bekannt ist. Außerdem ist die Hausmaus das Säugetier, von dem mindestens 300 Inzuchtstämme existieren (28). Ein besonderer Vorteil der Inzuchtstämme ist, daß ihr Erbgut weitgehend homozygot vorliegt, d.h. alle entsprechenden Allele sind identisch. Wenn man beim Vergleich von 2 verschiedenen Inzuchtstämmen Unterschiede in Bezug auf eine Eigenschaft findet, so kann Vererblichkeit dieser Eigenschaft vorliegen. Durch Kreuzungsexperimente mit den beiden Stämmen ist es dann möglich, Gene zu identifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß der Mäuse-Inzuchtstamm C3H/HeJ im Gegensatz zu vielen anderen Mäusestämmen unfähig ist, die nach Immunisierung mit Lipid A auftretenden Antikörper gegen normale Schaferythrozyten zu bilden.

Es wurde gefunden, daß der durch Lipid A bei Mäusen induzierte Antikörper gerichtet ist gegen die Erythrozyten von Pferden, Schafen, Ziegen, Kaninchen und Rindern. Man kann die Unspezifität des Lipid A-induzierten Antikörpers durch eine geringe räumliche Spezifität des Antikörpers erklären oder durch eine spezifische Bindung an ein Antigen, z.B. ein Lipoid, das bei vielen Spezies gemeinsam an den Erythrozyten vorkommt.

Eine weitere Besonderheit des Lipid A-induzierten Antikörpers ist die Tatsache, daß das Maximum der Antikörperbildung in der Milz bereits am 3. Tag nach Immunisierung erreicht wird und danach ein schneller Abfall der Zahl der Antikörper bildenden Zellen erfolgt. Der entsprechende Gipfel der frühesten bekannten IgM-Antikörper ist am 4. Tag und der anschließende Abfall ist langsamer (12).

Antikörperklassen unterscheiden sich durch Klassen-spezifische Primärstrukturen der sogenannten konstanten Teile sowie durch biologische Eigenschaften, z.B. die Fähigkeit zur Kom-

plementaktivierung oder die Kinetik des Auftretens nach Antigenstimulus (59). Die besondere Kinetik des Auftretens des Lipid A-induzierten Antikörpers spricht dafür, daß es eine Antikörperklasse gibt, die kurz nach dem Antigenstimulus kurzfristig auftritt.

Galanos et al. (26) haben einen durch Lipid A beim Kaninchen induzierten Antikörper beschrieben, der im Gegensatz zu dem hier untersuchten nicht mit SE kreuzreagiert und später auftritt.

Durch Kreuzungsexperimente wurde bewiesen, daß der Immundefekt des Mäusestammes C3H/HeJ, der die Bildung der Lipid A-induzierten Antikörper betrifft, auf einen Genort zurückzuführen ist. Bei der F1-Generation der Kreuzungen von immundefekten mit normalen Mäusen zeigte sich die Fähigkeit zur Lipid A-induzierten Antikörperbildung dominant. In der F2-Generation traten zur Immunantwort fähige und unfähige Tiere im Verhältnis 2,9 : 1 auf. Dieses Ergebnis kommt dem zu erwartenden Verhältnis von 3 : 1 für einen Mendelschen Genort sehr nahe.

Bei der Rückkreuzung der F1-Hybride mit reinerbig immundefekten C3H/HeJ-Mäusen traten 47,5 % fähige und 52,5 % unfähige Nachkommen auf. Bei einem Erbgang, der auf ein dominantes Allel für die Fähigkeit zur Antikörperbildung zurückzuführen ist, sind bei einer solchen Rückkreuzung 50 % fähige und 50 % unfähige Tiere zu erwarten. Würde die Fähigkeit durch ein Gen rezessiv vererbt werden, dann hätten bei dieser Rückkreuzung keine fähigen Tiere auftreten dürfen. Würde der Erbgang bedingt durch 2 Gene, wobei bei beiden Genen die Fähigkeit dominant ist, dann wären 25 % fähige Tiere zu erwarten. Bei der Annahme einer Vererbung durch 2 Gene mit rezessivem Verhalten der Fähigkeit eines oder beider Gene hätte man keine fähigen Tiere zu erwarten. Bei dem Erbgang durch mehr als 2 Gene hätte man höchstens 12,5 % fähige Tiere erhalten. Von allen Möglichkeiten kommt die genetische Kontrolle durch ein Gen mit dominantem Verhalten der Fähigkeit zur Antikörperbildung den Ergebnissen am nächsten.

Diese Ergebnisse traten nicht als Resultate von Umwelteinflüssen und statistischer Streuung auf, denn bei der Verfolgung des Erbganges bis in die 3. Generation konnten immundefekte Tiere nur dann beobachtet werden, wenn beide Eltern ebenfalls immundefekt waren.

Bei allen Versuchen wurde der Erbgang unabhängig vom Geschlecht gefunden. Die Möglichkeit einer zytoplasmatischen Vererbung wurde durch reziproke Kreuzungen ausgeschlossen.

McDevitt et al. haben beschrieben, daß die Fähigkeit, Antikörper gegen synthetische Polypeptide zu bilden, bei der Maus durch ein Gen Ir-1 vererbt wird, das auf dem 17. Chromosom liegt. Dieses Gen befindet sich in der Nähe des Genorts für die H2-Histokompatibilitätsantigene und beim Vergleich von Mäuserstämmen besteht eine enge Korrelation zwischen den Allelen des H2-Genorts und der Fähigkeit, Antikörper gegen Polypeptide zu bilden (44). Zwischen dem Lipid A-Antikörper-Genort und dem H2-Locus besteht bei einem entsprechenden Vergleich von Mäuserstämmen keine Korrelation (Tab. 5). Deshalb ist das Lipid A-Antikörper-Gen verschieden von dem Gen Ir-1 und gehört nicht zum 17. Chromosom.

Der Genort für die Lipid A-induzierte Antikörperbildung liegt wahrscheinlich nicht auf dem 2. Chromosom. Bei dem Versuch, der in Abb. 8 dargestellt ist, wurden schwarze C57Bl/6J-mit wildfarbenen (=Agouti) C3H/HeJ-Mäusen gekreuzt. Der Genort Agouti (A) liegt auf dem 2. Chromosom. Agouti ist dominant über schwarz (a) (28). Wenn das Gen für die Antikörperbildung und das Gen A auf demselben Chromosom lägen, dürfte in der F2-Generation kein Tier auftreten mit dem Genotyp a/a, immundefekt/immundefekt (Phänotyp: schwarzes Fell, Unfähigkeit zur Antikörperbildung). Bei 63 Mäusen der untersuchten F2-Generation sind aber 4 Tiere gefunden worden, die schwarz waren und keine Antikörper bilden konnten (Abb. 8). Auf dem 2. Chromosom liegt ein Gen Ir-2, das kontrolliert, wieviele Antigen-Injektionen notwendig sind, um eine Antikörperbildung gegen eine Mäuseblutgruppensubstanz zu bewirken (27). Weil der Genort für die Lipid A-Antikörper nicht auf dem 2. Chromosom liegt, ist er verschieden von diesem Gen Ir-2.

Die Antikörperbildung gegen synthetische Polypeptide steht unter der Kontrolle eines weiteren Gens, das nicht H2-gekoppelt vererbt wird und die Bezeichnung Ir-3 trägt. Die beiden Mäusestämme DBA/1J und SJL/J sind reinerbige Träger verschiedener Allele dieses Gens (48). Nach Lipid A bilden aber beide Stämme gleichermaßen Antikörper. Deshalb ist das Lipid A-Antikörper-Gen verschieden vom Gen Ir-3.

Die Mäusestämme NZB und NZW weisen eine vererbare Besonderheit bei der Antikörperbildung auf (39). Bei vielen älteren Tieren treten spontan Autoimmunerkrankungen auf. Die Lipid A-induzierte Antikörperbildung ist aber bei diesen Mäusestämmen normal (Tab. 5).

Für den Genort, der die Lipid A-induzierte Antikörperbildung gegen die in Tab. 4 aufgeführten Antigene bei Mäusen kontrolliert, schlage ich die provisorische Bezeichnung
Ir-L,

abgeleitet von "Immune response-Lipid A" vor und für die Allele, die Antikörperbildung ermöglichen, bzw. verhindern, die Abkürzungen Ir-L⁺ bzw. Ir-L⁻.

Die Analyse der genetischen Kontrolle des Auftretens von Antikörpern mit definierter Spezifität kann im Prinzip führen zum Auffinden der genetischen Kontrolle

- a) der Antikörper-Haftstelle,
- b) von Strukturen und Mechanismen, die an der Zuordnung des Antigens zum Antikörper beteiligt sind und
- c) des Antigen-Stoffwechsels.

Der in dieser Arbeit beschriebene Fall einer genetischen Kontrolle der Antigenerkennung ist Lipid A-spezifisch. Die Lipid A-immundefekten Mäuse können Schaferythrozyten und von Lipid A verschiedene Determinanten in LPS-Molekülen normal erkennen.

Bei einer normalen Immunantwort wirken Thymus- und Knochenmarkslimphozyten zusammen (46). Der congenital thymuslose Mäusestamm Balb/c/A/Bom-nu/nu zeigt dementsprechend nur schwache Immunantworten (38). Nach Lipid A-Injektion traten jedoch

Zellen mit Antikörpern gegen SE unvermindert auf (Tab. 5). Deshalb erfolgt die Lipid A-induzierte Antikörperbildung unabhängig vom Thymus und das hier beschriebene Gen kontrolliert keinen Schritt der Antigenerkennung durch Thymuslymphozyten. Da die Antikörper-bildenden Zellen zu den Knochenmarkslymphozyten (B-Zellen) gehören (45), wirkt das Gen bei einem Schritt, der zur Auslösung der Antikörperbildung in B-Zellen führt.

DiPauli und Rank (9, 10) haben berichtet, daß DBA/2AnIcr-Mäuse im Gegensatz zu Mäusen anderer Stämme nach Immunisierung mit *S. anatum*-LPS nicht in der Lage sind, diejenigen Antikörper zu bilden, die mit Polysacchariddeterminanten des *S. strasbourg*-LPS kreuzreagieren. DBA/2AnIcr-Mäuse können aber nach Lipid A normal Antikörper bilden (Tab. 5). Die durch *S. anatum*-LPS induzierte spezifische Antikörperbildung ist auch in vererbbar thymuslosen Mäusen möglich (10). Deshalb wird wahrscheinlich die in B-Zellen ohne Beteiligung von T-Zellen durch LPS induzierte Antikörperbildung von mindestens zwei Genen kontrolliert, einem Gen für Lipid A und mindestens einem weiteren Gen für O-Determinanten des Polysaccharidteils.

Zur weiteren Aufklärung der Wirkungsweise des Genorts Ir-L wurde nach zusätzlichen Phänotypen des Gens gesucht. Zu diesem Zweck wurde nach Unterschieden zwischen Unterstämmen des Mäuseinzuchtstammes C3H/He gesucht, die sich von der gemeinsamen Stammlinie in der Zeit vor und nach der Mutation des Genorts abspalteten und von denen anzunehmen ist, daß sie sich nur in der Mutation des Genorts Ir-L unterscheiden.

Ein solcher Unterschied zwischen Mäusestämmen mit verschiedenen Allelen des Genorts Ir-4 betraf die durch LPS oder Lipid A in der Bauchhöhle ausgelöste Entzündungsreaktion. Das Allel des Genorts Ir-L, das die Lipid A-induzierte Antikörperbildung nicht zuläßt, war im Gegensatz zum Allel für die Fähigkeit zur Lipid A-induzierten Antikörperbildung vergesellschaftet mit einer verstärkten Monozyten+Makrophagen-Reaktion, einem verminderten Anstieg der neutrophilen Granulozyten, einem verstärkten Follikellymphozytenanstieg, einem verminderten Abfall der Sinuslymphozyten, einer Zunahme der eosinophilen Granulozyten und dem Fehlen eines Abfalls der basophilen Granulozyten.

Vor dem Mutationseignis, das nach dem Jahre 1958 stattgefunden hat, waren beim Mäuse-Inzuchtstamm C3H/HeJ ungefähr 80 Bruder-Schwester-Inzuchtgenerationen erreicht worden. Man kann berechnen, daß bei 80 Generationen ein Anteil an heterozygoten Erbanlagen von weit weniger als einem Nukleotid-Paar der DNA verblieben war. Deshalb ist anzunehmen, daß sich Mäuse des Inzuchtstammes C3H/He aus der Zeit vor von Tieren nach der Mutation nur im Ir-L-Gen oder wenigen Genen unterscheiden. Mehrere Gene umfassende Mutationen, z.B. Deletionen, sind wahrscheinlich bei den hoch differenzierten Säugetieren letal. Die Möglichkeit, daß die Unterschiede zwischen den Mäusestämmen bei der Entzündung durch zusätzliche Mutationen bedingt sind, konnte durch die Untersuchung mehrerer Unterstämme ausgeschlossen werden. Zusätzliche Mutationen sind zufällig auf die Unterstämme verteilt zu erwarten. In Bezug auf die Entzündungsreaktion verhielten sich aber die Unterstämme im Rahmen der Streuung wie homogene Gruppen.

Die Ergebnisse bedeuten deshalb, daß die Art und das Ausmaß der LPS- oder Lipid A-induzierten Entzündungsreaktion in der Bauchhöhle vom Genort Ir-L abhängt, wobei alle normalerweise in der Bauchhöhle vorkommenden Zellen wie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten betroffen sind und daß ein Zusammenhang zwischen der Entzündungsreaktion und der Antikörperbildung besteht, da beide Reaktionen durch einen Genort kontrolliert werden.

Bei den vererbbar thymuslosen Mäusen des Stammes Balb/c/A/Bom-nu/nu wurde das Fehlen der Follikellymphozyten beobachtet (Abb. 10). Daraus kann man schließen, daß die Follikellymphozyten identisch mit den Thymus-abhängigen Lymphozyten sind.

Ein weiterer Unterschied zwischen Unterstämmen des Mäuse-Inzuchtsstammes C3H/He, die sich gemeinsam nur in den Allelen des Genorts Ir-L unterscheiden, wurde bei dem durch LPS ausgelösten Körpertemperaturabfall gefunden. Bei Mäusen, die unfähig zur Lipid A-induzierten Antikörperbildung sind, veränderte sich nach einer hohen LPS-Dosis die Körpertemperatur nicht. Bei Mäusen, die die Lipid A-induzierten Antikörper bil-

den können, fiel die Temperatur ungefähr 2 Stunden nach LPS-Injektion ab. Ein hoher Prozentsatz der unterkühlten Tiere erholte sich nicht mehr und starb zwischen 12 und 24 Stunden nach der LPS-Injektion (Tab. 10, 11, 12). Zusammen mit den Resultaten über den Erbgang des LPS-induzierten Temperaturabfalls sprechen die Ergebnisse für eine Kontrolle des LPS-induzierten Körpertemperaturabfalls und der letalen toxischen Wirkung von LPS durch den Genort Ir-L.

Ein Abfall der Körpertemperatur kann bei Mäusen ein Symptom eines anaphylaktischen Schocks sein (37) und der LPS-induzierte Temperaturabfall könnte als eine anaphylaktische Reaktion durch präformierte Lipid A-Antikörper erklärt werden.

Es ist aber bekannt, daß LPS und Lipid A die Komplement-Komponente C3 aktivieren, ohne daß Antikörper wie beim bekannten Weg der Komplementaktivierung erforderlich sind ("Alternative pathway") (8). Diese Tatsache könnte die in dieser Arbeit aufgezeigte genetische Kontrolle der LPS- und Lipid A-Wirkungen wie die Antikörperbildung, die Entzündung, den Temperaturabfall und den Tod durch einen einzigen Genort über die Kontrolle eines Komplementfaktors oder Komplementrezeptors erklären: LPS oder Lipid A aktivieren die Komplementkomponente C3 (8). Aktiviertes C3 reagiert (13) mit dem bekannten (14) Rezeptor auf B-Lymphozyten für aktiviertes C3. Diese Reaktion löst die unspezifische Antikörperbildung aus. Mit dieser Vorstellung steht der Befund im Einklang, daß die Lipid A-induzierte Antikörperbildung noch in thymuslosen Mäusen, bei welchen die T-Zellen fehlen, möglich ist (Tab. 5).

Daß dieser denkbare Weg der Induktion einer Antikörperbildung über die Aktivierung von Komplement tatsächlich von Mäusen benutzt wird, geht aus den Befunden hervor, daß ein Faktor aus Kobraschlangengift (13) und hochmolekulares Dextransulfat (Molekulargewicht: 500 000) (11) ebenso wie Lipid A die Komplementkomponente C3 ohne Antikörper aktivieren. Diese Faktoren können wie Lipid A (Tab. 5) eine Antikörperbildung gegen SE in Zellen thymusloser Mäuse auslösen (13, 29). Die Antikörper wurden dabei mit derselben Methode wie die Lipid A-induzierten nachgewiesen.

Die Komplementaktivierung durch Lipid A kann demnach den Temperaturabfall und die Entzündung erklären. Eine Beteiligung des Komplementsystems an der Pathogenese des Endotoxinschocks wurde beschrieben (23). Bei der Interaktion von Komplement mit LPS entstehen chemotaktische Faktoren (41) und zu der durch LPS induzierten Ansammlung von neutrophilen Granulozyten sind die Komplementkomponenten C1 bis C5 erforderlich (61).

Diesen Befunden entsprechend könnte man annehmen, daß das Gen Ir-L eine Komponente der Antikörper-unabhängigen Komplementaktivierung kontrolliert, oder den B-Zellrezeptor für die aktivierte Komplementkomponente C3, oder einen intrazellulären, vom Rezeptor stimulierten Schritt. Der rezessive Erbgang des Lipid A-Immundefekts steht mit dieser Annahme im Einklang.

Mit der Methode der Autoradiographie wurde gezeigt, daß Makrophagen Endotoxin aufnehmen und in einer noch immunogenen Form an Lymphozyten weitergeben können (6). Deshalb kann man auch in Betracht ziehen, daß das Gen Ir-L einen Schritt der Aufnahme von Endotoxin in Makrophagen oder der Weitergabe an Lymphozyten kontrolliert.

Ein Lipid A abbauendes Enzym (47) kann den Immundefekt nicht erklären, denn dann müßte der Erbgang des Defekts dominant erfolgen.

Zusammenfassung

1. Alle Lipopolysaccharide von 39 untersuchten Bakterienstämmen induzieren bei normalen weißen Mäusen vom Stamme SaB komplementbindende Antikörper gegen Schaferythrozyten (SE) (Tab. 1, 2). Zusammen mit Hinweisen aus der Literatur (Tab. 3) und der Tatsache, daß sich dieser Antikörper auch mit der Lipid A-Komponente verschiedener LPS auslösen läßt, sprechen die Ergebnisse dafür, daß alle Lipid A-haltigen LPS einen Antikörper induzieren können, der mit SE kreuzreagiert.
2. Eine Besonderheit dieses Antikörpers ist ein weites Spektrum an Kreuzreaktionen. Er reagiert mit Erythrozyten von Pferden, Schafen, Ziegen, Kaninchen und Rindern (Tab. 4).
3. Die stärkste Antikörperbildung erfolgt meist am 3. Tag nach Lipid A-Injektion und ist bereits bis zum 5. Tag wieder abgefallen. Damit zeigt dieser Antikörper von allen bekannten Antikörpern den frühesten Gipfel nach Antigenstimulus und das schnellste Wiederverschwinden.
4. Der Antikörper wird unabhängig vom Thymus gebildet. Vererbbar thymuslose Mäuse können den Antikörper noch bilden.
5. Unter 34 Mäusestämmen wurde einer (C3H/HeJ) gefunden, der unfähig ist, die Lipid A-induzierten Antikörper zu bilden. Der Immundefekt konnte auf eine Spontanmutation zurückgeführt werden, die im Zeitraum der Jahre von 1958 bis 1968 im Inzuchtkern des Mäusestammes C3H/HeJ aufgetreten war.
6. Mit der Mutante wurde ein Mendelscher Genort identifiziert, der die Fähigkeit kontrolliert, nach Lipid A-Injektion die mit SE kreuzreagierenden Antikörper zu bilden. Die Fähigkeit wird dominant vererbt. Der Genort erhält die provisorische Bezeichnung Ir-L.
7. Dieser Genort kontrolliert außerdem die Entzündungsreaktion, die in der Bauchhöhle durch Lipopolysaccharide oder Lipid A hervorgerufen wird, und die nach großen Lipopolysaccharid-Dosen auftretenden Effekte des Körpertemperaturabfalls und der letalen toxischen Reaktion.

8. Die Allele dieses Genorts $Ir-L^+$ bzw. $Ir-L^-$ bewirken bei den Lipopolysaccharid- oder Lipid A-induzierten Effekten im Vergleich zueinander:
- a) das Auftreten bzw. Nichtauftreten der Antikörper gegen SE nach Lipid A- oder Lipopolysaccharid-Injektion,
 - b) einen Abfall oder ein Gleichbleiben oder einen schwachen Anstieg der Monozyten + Makrophagen gegenüber einem stärkeren Anstieg,
 - c) einen starken gegenüber einem schwachen Anstieg der neutrophilen Granulozyten,
 - d) einen stärkeren gegenüber einem geringeren Anstieg der Follikellymphozyten,
 - e) einen stärkeren gegenüber einem schwächeren Abfall der Sinuslymphozyten,
 - f) ein Gleichbleiben gegenüber einem Anstieg der eosinophilen Granulozyten,
 - g) einen Abfall gegenüber einem Gleichbleiben der basophilen Granulozyten,
 - h) einen Abfall gegenüber einem Gleichbleiben oder Anstieg der Körpertemperatur,
 - i) das Absterben gegenüber dem Überleben tödlicher Dosen Endotoxin.
9. Nach der Immunisierung mit einem Lipopolysaccharid kontrolliert das Gen $Ir-L$ nur die durch die Lipid A-Komponente, nicht jedoch die durch Polysaccharid-Determinanten desselben Moleküls induzierten Antikörper.
10. Damit wurde gezeigt, daß nach Immunisierung mit dem bei Darmbakterien weit verbreitet vorkommenden Lipid A unter der Determinanten-spezifischen Kontrolle eines Gens Thy-mus-unabhängig ein ganz früher Antikörper mit einem weiten Reaktionsspektrum auftritt. Auf Grund der Kontrolle durch das gemeinsame Gen stehen die Erkennung von Lipid A als Antigen, die Entzündungsreaktion, der Körpertemperaturabfall und die letale Endotoxinwirkung in einem noch nicht näher bekannten Zusammenhang. Die Möglichkeiten, wie das Gen wirken könnte, werden besprochen.

Literaturverzeichnis

- 1.) Batchelor, J.R., and B.A. Chapman, Immunology, 9, 553 (1965).
- 2.) Berger, F.M., G.M. Fukui, B.J. Ludwig, and I.P. Roselet, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 131, 1376 (1969).
- 3.) Braun, W., and M. Nakano, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119, 701 (1965).
- 4.) Breed, R.S., E.G.D. Murray, and N.R. Smith, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7. Auflage, Baltimore 1957.
- 5.) Brittinger, G., F.-H. Kayser, G. Nass und G. Ruhenstroth-Bauer, Z. f. Naturforsch., 17b, 606 (1962).
- 6.) Bona, C.A., in: Bacterial Lipopolysaccharides, Hrg: E.H. Kass, and S.M. Wolff, Chicago (1973), p. 74.
- 7.) Cheng, V., and J.J. Trentin, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 126, 467 (1967).
- 8.) Dierich, M.P., D. Bitter-Suermann, W. König, U. Hadding, C. Galanos, and E.T. Rietschel, Immunol., 24, 721 (1973).
- 9.) DiPauli, R., and W.-R. Rank, Immunochemistry, 7, 869 (1970).
- 10.) DiPauli, R., J. Immunol., 109, 394 (1972).
- 11.) Dörries, R., A. Schimpl, and E. Wecker, Eur. J. Immunol., 4, 230 (1974).
- 12.) Dresser, D.W., and H.H. Wortis, Nature, 208, 859 (1965).
- 13.) Dukor, P., G. Schumann, R.H. Gisler, M. Dierich, W. König, U. Hadding, and D. Bitter-Suermann, J. Exp. Med., 139, 337 (1974).
- 14.) Eden, A., C. Bianco, V. Nussenzweig, and M.M. Mayer, J. Immunol., 110, 1452 (1973).
- 15.) Festing, M.F.W., International Index of Laboratory Animals, Carshalton, 1968.
- 16.) Finger, H., P. Emmerling, and H. Schmidt, Experientia, 23, 591, 849 (1967).
- 17.) Finger, H., G. Beneke, and Fresenius H., Pathol. Microbiol., 35, 324 (1970).

- 18.) Freedman, H.H., Nakano, M., and W. Braun, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 121, 1228 (1966).
- 19.) Freedman, H.H., A.E. Fox, and B.S. Schwartz, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 125, 583 (1967).
- 20.) Freedman, H.H., A.E. Fox, R.S. Willis, and B.S. Schwartz, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 125, 1316 (1967).
- 21.) Freedman, H.H., A.E. Fox, R.S. Willis, and B.S. Schwartz, J. Bacteriol., 95, 286 (1968).
- 22.) Friedman, H., J. Bacteriol., 92, 820 (1966).
- 23.) From, A.H.L., H. Gewurz, R.P. Brunninger, R.J. Pickering, W.W. Spink, Infec. Immunit. 2, 38 (1970).
- 24.) Fruhmman, G.J., Ann. N.Y. Acad. Sci., 113, 968 (1964).
- 25.) Furuhashi, T., The Japan. medical world, 7, 197 (1927).
- 26.) Galanos, C., O. Lüderitz, and O. Westphal, Eur. J. Biochem., 24, 116 (1971).
- 27.) Gasser, D.L., J. of Immunol., 103, 66, 579 (1969); 105, 908 (1970).
- 28.) Green, E.L. (Ed.), Biology of the Laboratory Mouse, 2. Edition.
- 29.) Hadding, U., M. Limbert, H.-U. Schorhemmer, and D. Bitter-Suermann, Joint Meeting of European Societies for Immunology, Strasbourg (1973), p. 32.
- 30.) Hallman, L., Klinische Chemie und Mikroskopie, Stuttgart (1960).
- 31.) Harms, H. (Hrg.), Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie.
- 32.) Heckner, F. (Hrg.), Leitfaden der Blutzellkunde, München-Berlin, 1965.
- 33.) Hege, J.S., and L.J. Cole, J. Immunol., 99, 61 (1967).
- 34.) Howard, J.G., D. Rowley, and A.G. Wardlaw, Immunology, 1, 181 (1958).
- 35.) Iseki, S., and J. Gunma, Japanese Med. Sci., 1, 1 (1952).
- 36.) Jerne, N.K., A. Nordin, C. Henry, H. Funi, and A. Koros, Information Exchange Group, No. 5, Immunopathology.
- 37.) Kind, L.S., J. Immunol., 74, 387 (1955).

- 38.) Kindred, B., *Europ. J. Immunol.*, 2, 138 (1972).
- 39.) Lambert, P.H. *Clin. Exp. Immunol.*, 6, 829 (1970).
- 40.) Les, E.P., persönl. Mitteilung.
- 41.) Lichtenstein, L.M., H. Gewurz, N.F. Adkinson, H.S. Shin, and S.E. Mergenhagen, *Immunol.*, 16, 327 (1969).
- 42.) Lüderitz, O., *Angewandte Chemie*, 82, 708 (1970).
- 43.) Lüderitz, O., K. Jann, and R. Wheat, in: Florkin, M., and E.H. Stotz (Hrg.), *Comprehensive Biochemistry*, Elsevier, Amsterdam, 26A, 105 (1968).
- 44.) McDevitt, H.O., *Science*, 163, 1207 (1969).
- 45.) Miller, J.F.A.P., J. Sprent, A. Basten, and N.L. Warner, *Nature New Biology*, 237, 18 (1972).
- 46.) Miller, P.A.F., *J. Int. Rev. Cytology*, 33, 77 (1972).
- 47.) Moreau, S.C., and R.C. Scarnes, in: *Bacterial Lipopolysaccharides*, Hrg.: Kass, E.H., and S.M. Wolff, Chicago (1973), p. 114.
- 48.) Mozes, E., G.M. Shear, M. Sela, and W. Braun, *J. Immunol.*, 111, 439 (1973).
- 49.) Oudin, J., *J. Cell. Comp. Physiol.*, 67, Suppl. 1 (1966).
- 50.) Rajewsky, K., and H. Polit, in: *Progress in Immunol.*, (D.B. Amos, Ed.), p. 337, New York, 1971.
- 51.) Rank, W.-R., Dissertation, Universität München, 1969.
- 52.) Rank, W.-R., and G. Ruhenstroth-Bauer, *Mouse News Letter*, 47, 53 (1972).
- 53.) Rank, W.-R., R. DiPauli, and U. Flügge-Rank, *Eur. J. Immunol.*, 2, 517 (1972).
- 54.) Rietschel, E.Th., Vortragsreferate der 3. Tagung der Gesellschaft f. Immunologie, Marburg (1971), S. 39.
- 55.) Schmidt, G., E. Eichenberger, and O. Westphal, *Experientia*, 14, 290 (1958).
- 56.) Schwarz, S.A., and W. Braun, *Science*, 149, 200 (1965).
- 57.) Searle, A.G. (Hrg.), *Mouse News Letter*, 49, 3, 17 (1973).
- 58.) Shear, M.I., *J. Nat. Cancer Inst.* 4, 81, 107, 123 (1943).
- 59.) Smith, G.P., L. Hood, and W.M. Fitch, *Annual Rev. Biochem.*, 40, 969 (1971).

- 60.) Snell, E.S., in: Kadis, S., G. Weinbaum, S.J. Ajl (Ed.), Microbial Toxins, Vo. V, New York (1971) p. 277.
- 61.) Snyderman, R., J.K. Phillips, S.E. Mergenhagen, J. Exp. Med., 134, 1131 (1971).
- 62.) Staats, J., Cancer Research, 32, 1609 (1972).
- 63.) Sulzer, B.M., Nature, 219, 1253 (1968); J. Immunol., 103, 32 (1969); Infection and Immunol., 5, 107 (1972).
- 64.) Terres, G., S.L. Morrison, and G.S. Habicht, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 126, 84 (1967).
- 65.) Watson, D.W., and Y.B. Kim, in Landy, M., and W. Braun (Hrg.), Bacterial Endotoxins, New Brunswick, (1964).
- 66.) Westphal, O., D. Hammer, O. Lüderitz, A. Nowotny, E. Eichenberger, and F. Goebel, Z. f. Naturforschung, 13 b, 572 (1958).
- 67.) Westphal, O., Z. f. Naturforsch., 7b, 148 (1952); Annals Inst. Pasteur, 98, 6, 51 (1960); J. of Bacteriol., 88, 1482 (1964).
- 68.) Westphal, O., Angewandte Chemie, 66, 407 (1954).

Fräulein U. Eichelsbacher bin ich für die ausgezeichnete technische Hilfe sehr zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Geboren: am 15. 4. 1945 in Meierhof bei Schwarzenbach am Wald
(Frankenwald)

Vater: Herr Alfred Rank, Lehrer, später Kaufmann in Hof an der
Saale

Mutter: Frau Amanda Rank, geb. Weber, Kauffrau

Volksschule: 1951 bis 1955 in Hof

Mädchenrealgymnasium mit Abitur: 1955 bis 1965 in Hof

Studium der Humanmedizin mit Staatsexamen: 1965 bis 1972, Uni-
versität München

Eheschließung: 1969 mit Dr. med. K. Flügge, Facharzt für Anäs-
thesie

Beginn der Dissertation: 1969 am Max-Planck-Institut für Bio-
chemie

Approbation: 1974

Facharztweiterbildung in Labormedizin: 1974

